

# ELEKTROPHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON PRIMÄREN AFFERENZEN UND WIRKUNGEN DES NEUROPEPTIDS CALCITONIN GENE-RELATED PEPTIDE IM HALBSCHÄDELPRÄPARAT DER RATTE

**SUSANNE BÄR**

## INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. M. Diener  
und  
dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie der  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
Betreuer: Prof. Dr. K. Meßlinger

**Elektrophysiologische Eigenschaften von  
primären Afferenzen und Wirkungen des  
Neuropeptids Calcitonin Gene-Related Peptide  
im Halbschädelpräparat der Ratte**

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Susanne Bär**

Tierärztin aus Frankfurt am Main

Gießen 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Diener  
Prof. Dr. K. Meßlinger

Tag der Disputation: 16.10.2009

FÜR LEONARD  
FÜR MEINE ELTERN



## Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen.....	IX
1    Einleitung .....	1
1.1 Neurobiologie.....	1
1.2 Eigenschaften primärer Afferenzen der Meningen .....	3
1.3 Neuropeptid Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) .....	6
1.4 In-vitro Modelle in der Elektrophysiologie .....	10
1.5 „Marking“-Methode aus der Mikroneurographie .....	11
1.6 Aktivitätsinduzierte Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing) .....	13
1.7 Aufgabenstellung .....	17
2    Material .....	19
2.1 Chemikalien und Lösungen .....	19
2.1.1 Chemikalien .....	19
2.1.2 Lösungen .....	20
2.2 Geräte und Laborbedarf .....	21
2.2.1 Elektrophysiologische Versuchsanordnung .....	21
2.2.2 Laborbedarf.....	22
2.2.3 Sonstige Geräte .....	22
2.2.4 Software .....	22
3    Methoden .....	24
3.1 Versuchstiere .....	24
3.2 Durchführung der Schädelpräparation.....	24
3.3 Versuchsaufbau und elektrische Ableitung.....	26
3.4 Klassifizierung und Charakterisierung der Nervenfasern .....	29
3.4.1 Temperaturreiz.....	30
3.4.2 Mechanische Druckreize mit von-Frey-Filamenten.....	30
3.4.3 Chemischer Reiz durch Capsaicin .....	31
3.4.4 Aktivitätsinduzierte Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing) .....	31
3.5 Versuchsprotokolle .....	32



3.5.1	Experimente mit Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) ..	32
3.5.2	Experimente mit aktivitätsinduzierter Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing) unter CGRP, CGRP <sub>8-37</sub> und Glibenclamid .....	34
3.6	Auswertung und Statistik .....	36
4	Ergebnisse .....	39
4.1	Eigenschaften primärer Afferenzen der Dura mater der Ratte .....	39
4.2	Wirkung von CGRP auf primäre Afferenzen der Dura mater.....	47
4.3	Einfluss von CGRP, CGRP <sub>8-37</sub> und Glibenclamid auf die aktivitätsinduzierte Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing) .....	51
4.3.1	Wirkung von CGRP auf den Verlauf der Slowingkurve.....	51
4.3.2	Wirkung von CGRP <sub>8-37</sub> und CGRP .....	52
4.3.3	Einfluss von Glibenclamid auf die CGRP-Wirkung .....	55
5	Diskussion.....	56
5.1	In-vitro Dura-Nervenpräparat.....	58
5.2	Eigenschaften primärer Afferenzen der Dura mater der Ratte .....	59
5.3	Einfluss von CGRP auf Nervenfasern der Dura mater .....	61
5.3.1	Hauptversuche CGRP-Wirkung Teil 1 .....	61
5.3.2	Hauptversuche CGRP-Wirkung Teil 2 .....	64
5.3.3	Hauptversuche CGRP-Mechanismus .....	65
5.3.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	68
6	Zusammenfassung .....	70
7	Summary.....	72
8	Literaturverzeichnis.....	74
9	Danksagung.....	81
	Erklärung.....	82

### Verzeichnis der Abkürzungen

AC	Adenylatcyclase
AP	Aktionspotential
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destilata
BIBN4096BS	[R-(R*,S*)]-N-[2-[[5-amino-1-[[4-(4-pyridinyl)-1-piperazinyl]carbonyl]pentyl]amino]-1-[(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)methyl]-2-oxoethyl]-4-(1,4-dihydro-2-oxo-3(2H)-quinazolinyl)-,1-piperidinecarboxamide
cAMP	zyklisches (cyclic)- 3`5`-Adenosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CGRP <sub>8-37</sub>	Calcitonin Gene-Related Peptide <sub>8-37</sub>
(Cys(Acm <sup>2,7</sup> ) $\alpha$ -CGRP	Cystein-Acetaminomethyl(2-7)- $\alpha$ -Calcitonin Gene-Related Peptide
CRLR / CL	Calcitonin-receptor-like receptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
LG	Leitungsgeschwindigkeit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration
RAMP	Receptor activity-modifying proteins
RCP	Receptor component protein
RI	Reizimpuls
SIF	Synthetische interstitielle Flüssigkeit
SEM	Standard Error of the Mean
TVS	Trigemino-Vaskuläres System
ZNS	Zentralnervensystem



## 1 **Einleitung**

### 1.1 **Neurobiologie**

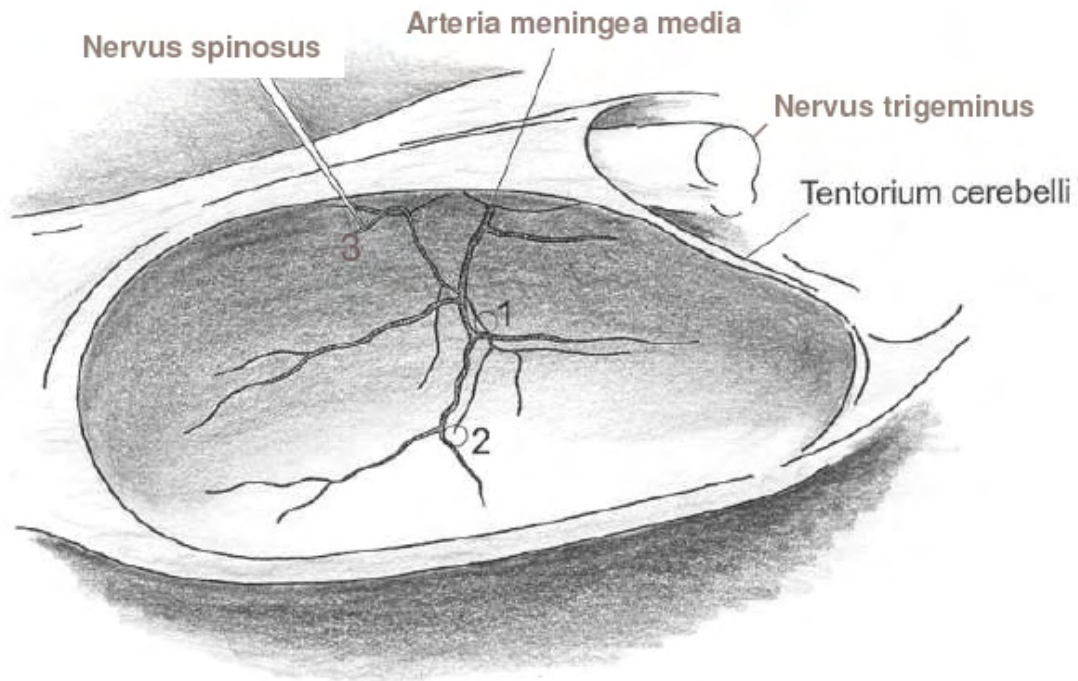
Das Zentralnervensystem (ZNS) ist eines der wenigen lebenswichtigen Organsysteme, dem nozizeptive Strukturen für eine eigene Schmerzwahrnehmung fehlen. Die sensorische Innervation der Meningen und der großen intracerebralen Arterien übernimmt die Aufgabe der Nozizeption für das ZNS.

Die Dura mater bildet die äußerste der drei Hirnhäute, die das ZNS umschließen. Sie hat eine derbe, gefäßarme und fibrinöse Struktur. Die Dura mater encephali ist an den in die Schädelhöhle vorspringenden Knochenleisten und an der Sella turcica mit dem Periost des Schädels verbunden.

Die extracerebral liegende Dura mater encephali schützt das Cerebrum vor noxischen Reizen. Primäre Afferenzen der Dura registrieren aber selbst noxische (schmerzhaft thermische, chemische und mechanische) Reize. Diese Afferenzen sind sensible pseudounipolare Neurone mit Zellkörpern im Ganglion trigeminale. Der nozizeptive Input wird über das ipsilaterale Ganglion trigeminale an Neurone höherer Ordnung im spinalen trigeminalen Kern des Hirnstamms weitergeleitet (Edvinsson and Uddman, 2005).

Der Nervus trigeminus, der V. Hirnnerv, spaltet sich im Ganglion trigeminale in drei Hauptäste auf: den Nervus ophthalmicus, den Nervus maxillaris und den Nervus mandibularis. Beim Austritt aus dem Ganglion geben alle drei Nerven sensorische Äste (Rami meningei) an die Dura mater ab. Der Ramus meningeus des Nervus mandibularis verläuft durch das Foramen spinosum zur Arteria meningea media. Dieser Nervenast wird beim Menschen als Nervus spinosus bezeichnet. Caudal verläuft der Anteil des

Nervus ophthalmicus zum Tentorium cerebelli. Über eine Abzweigung des Nervus nasociliaris wird der rostrale Anteil der Dura mater versorgt.



**Abbildung 1:** Schema eines Rattenhalbschädels in medianer Ansicht mit den, für den Versuchsaufbau wichtigen anatomischen Strukturen. Das Schädeldach zeigt zur Bildunterseite. Der in den Versuchen abgeleitete Nervenast entspringt dem Ramus meningeus des Nervus mandibularis. Punkt 1 markiert den Verlauf des sensiblen Astes, Punkt 2 die freie Nervenendigung und Punkt 3 die elektrophysiologische Ableitungsstelle. Hier wurde der Nervenast vom Hauptnerv abgetrennt.

Die gesamte sensorische intracranielle Innervation mit den zugehörigen Gefäßen wird als Trigemino-Vaskuläres System (TVS) bezeichnet. Eine der Hauptaufgaben des TVS scheint die Registrierung und Kontrolle des cerebralen und meningealen Blutflusses zu sein, woran die sensiblen Fasern mit ihren Neuropeptiden wie Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) und Substanz P beteiligt sind. Diese Neuropeptide werden auch freigesetzt, wenn die Nerven durch noxische Reize stimuliert werden.

Die trigeminalen Afferenzen sind überwiegend unmyelinisierte C-Fasern und schwach myelinisierte A<sub>δ</sub>-Fasern (Goadsby, 2005). C-Fasern haben Durchmesser kleiner als 2 µm und Leitungsgeschwindigkeiten von weniger als 2 m/s. Sie vermitteln im Allgemeinen den dumpfen, schwer lokalisierbaren Schmerz. A<sub>δ</sub>-Fasern haben Durchmesser von etwa 2 bis 5 µm und Leitungsgeschwindigkeiten von 2 bis 30 m/s. Ihnen wird der helle, deutlich lokalisierbare Schmerz zugeschrieben. Bei intracraniellen Afferenzen, die für den Kopfschmerz verantwortlich gemacht werden, ist diese Zuordnung bisher unklar.

### **1.2 Eigenschaften primärer Afferenzen der Meningen**

Schmerz ist die einzige Sinneswahrnehmung, die durch Stimulation der intracranialen Meningen ausgelöst werden kann und zwar unabhängig von der Art des Stimulus. Zu dieser Erkenntnis kamen Ray und Wolff im Jahr 1940, als sie bei Hirnoperationen intraoperativ an wachen Probanden unter Lokalanästhesie die Dura mater encephali und die umliegenden größeren Gefäße mechanisch und elektrisch stimulierten und die Patienten dabei ausschließlich schmerzhaft empfindungen angaben (Ray and Wolff, 1940).

Eine wichtige Frage ist, ob durale Afferenzen ähnliche Eigenschaften haben wie polymodale Nozizeptoren, wie sie z.B. in der Haut vorkommen. Polymodale Sinnesrezeptoren werden durch mindestens zwei Stimuli unterschiedlicher Modalität (z.B. mechanisch und thermisch) aktiviert. Eine charakteristische Eigenschaft von Nozizeptoren ist die Sensibilität für schmerzhaft chemische Substanzen, unter anderem für endogene Mediatoren, die im Falle von Gewebeverletzungen und Entzündungen freigesetzt werden (Strassman and Levy, 2006).

Zwei tierexperimentelle Veröffentlichungen aus den Jahren 1996 und 1997 geben weiteren Aufschluss über die Eigenschaften primärer Afferenzen der

Meningen. Strassman und Burstein (1996) untersuchten in einem in-vivo Modell durch extrazelluläre Ableitungen an der Ratte die sensorischen Eigenschaften von Zellen des Ganglion trigeminale, die die cranialen Meningen afferent versorgen. Sie fanden durch elektrische Stimulation der freigelegten parietalen Dura mater Neurone, deren Axone den A<sub>δ</sub>- und C-Fasern zugeordnet wurden. Es wurden mechanische sowie chemische Reize getestet: hypertone Kochsalzlösung (KCl, 400 mM), Natriumchloridlösung (NaCl, 150 mM), pH-neutrale Pufferlösung mit niedriger Osmolarität und eine Lösung aus inflammatorischen Substanzen (Histamin, Serotonin, Bradykinin und Prostaglandin E<sub>2</sub>) mit einem pH - Wert von 5. Diese Untersuchungen zeigten, dass 73,3% der Neurone mechanosensitiv waren und etwa die Hälfte (46,67%) durch mehrere Stimuli aktiviert wurden, also polymodal waren. Außerdem untersuchten die Autoren erstmals die chemisch induzierte Sensibilisierung der primären Afferenzen für mechanische Stimuli. Die Antwort auf den mechanischen Reiz war nach Applikation der inflammatorischen Lösung signifikant höher als vorher. Eine von zwei Fasern zeigte einen Wechsel von mechanoinsensitiv zu mechanosensitiv nach dem chemischen Reiz. Damit wurde bestätigt, dass es eine chemisch induzierte Sensibilisierung für mechanische Stimuli bei meningealen Afferenzen gibt. Diese gesteigerte Mechanosensitivität könnte im Zusammenhang mit den Kopfschmerzen bei Meningitis oder Migräne stehen, denn bei solchen Zuständen führen an sich harmlose Aktivitäten, die den intracranialen Druck erhöhen oder zu einer Änderung der Hämodynamik führen, wie zum Beispiel Husten, Atem Anhalten und plötzliche Kopfbewegungen, zu einer Verstärkung der Kopfschmerzen (Strassman et al., 1996).

Mit einer in-vivo Ableitung von Filamenten des Nervus nasociliaris beim Meerschweinchen untersuchten Bove und Moskowitz (1997) intracraniale trigeminale Afferenzen, die die Dura mater der vorderen Schädelgrube innervieren. Die Fasern wurden durch ihre Antworten auf mechanische

Stimuli der freigelegten Dura mater aufgesucht und anhand von mechanischen, thermischen und chemischen Reizen charakterisiert. Insgesamt wurden 38 Fasern untersucht, die von 14 Tieren stammten. Auch hier wurden die afferenten Fasern nach ihren Leitungsgeschwindigkeiten den A<sub>δ</sub>-Fasern und C-Fasern zugeordnet. Die Fasern wurden mechanisch und chemisch (isotone Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (35°C), pH 5,0) gereizt. Des Weiteren wurden sie mit einer Lösung mit inflammatorischen Mediatoren, mit Capsaicin (10 µM) sowie mit Hitze und Kälte stimuliert. In 47,3% der Fälle reagierten die Fasern auf den thermischen, den chemischen und den mechanischen Reiz.

Aufgrund dieser Ergebnisse kamen die Autoren zu der Feststellung, dass die meningealen Afferenzen eine relativ homogene Gruppe bilden, deren Eigenschaften denen der polymodalen Nozizeptoren entsprechen. Allerdings lagen bei den Afferenzen, die durch Hitze aktiviert werden konnten, die Schwellenwerte (32,3 bis 42°C) niedriger als bei den Nozizeptoren der Haut (Bove and Moskowitz, 1997).

In der Haut werden zwei Typen von hitzesensiblen Afferenzen unterschieden, die nach ihrer Aktivierungsschwelle auf noxische Hitze klassifiziert wurden. Die Typ II-Population, die im Bereich von ca. 43°C aktiviert wird, besteht aus A<sub>δ</sub>-Fasern und C-Fasern. 43°C ist auch die Schmerzschwelle, bei der nicht mehr Wärme, sondern (potentiell gewebeschädigende) Hitze empfunden wird. Des Weiteren existiert eine Typ I-Subpopulation von A<sub>δ</sub>-Fasern, die eine hohe Aktivierungsschwelle (ca. 52°C) aufweisen (Patapoutian et al., 2003).

Ein Hauptanteil der temperaturempfindlichen Typ II-Axone reagiert ebenfalls auf die Substanz Capsaicin. Capsaicin ist der Inhaltsstoff der scharfen Chillischoten und führt zu einer momentanen Erregung mit Übererregbarkeit. Häufig folgt darauf eine Unerregbarkeit der Nervenzelle für weitere mechanische, elektrische oder chemische Reize. Diese



Erregung wird über die Aktivierung der TRPV1-Kanäle vermittelt. TRPV1 steht für *transient receptor potential vanniloid Typ1*. Dies ist ein unspezifischer Kationenkanal, der eine starke Sensitivität für hohe Temperaturen aufweist. Der TRPV1-Kanal ist damit in erster Linie für die Sensitivität der Afferenzen für noxische Hitze ( $> 42^{\circ}\text{C}$ ) verantwortlich (Patapoutian et al., 2003).

### 1.3 Neuropeptid Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)

Nozizeptoren können neben der afferenten Funktion aus ihren peripheren und zentralen Endigungen Neuropeptide freisetzen. Diese kurzkettigen Peptide, nach ihrer Funktion auch Neuromodulatoren genannt, sind Botensubstanzen. Sie sind vasoaktiv und wirken daneben möglicherweise auch parakrin oder autokrin auf afferente Fasern. Sie koexistieren mit klassischen Neurotransmittern, zum Beispiel mit L-Glutamat, wobei im Gegensatz zu diesen die Effekte der Neuropeptide eine lange Zeitkonstante bis in den Minutenbereich haben. Im afferenten (nozizeptiven) Nervensystem gehören zu diesen Neuropeptiden Substanz P, Neurokinin A und Calcitonin Gene-Related Peptide (Edvinsson, 2004). CGRP kommt häufig kolokalisiert mit Substanz P in den primären duralen Afferenzen vor (Wimalawansa, 1996).

CGRP ist ein Peptid aus 37 Aminosäuren und wird der Calcitonin-Familie zugeordnet. Zu dieser gehören neben CGRP auch Calcitonin, Adrenomedullin (1 + 2) und Amylin (Poyner et al., 2002). Rosenfeld fand 1983 in Nervengewebe eine mRNA, die durch alternatives Spleißen der RNA aus dem Calcitonin-Gen entsteht, und deren Endprodukt deshalb als CGRP bezeichnet wurde (Rosenfeld et al., 1983). Diese alternativ gespleißte mRNA findet man häufig im zentralen und peripheren Nervensystem, während die mRNA von Calcitonin hauptsächlich in den C-Zellen der Schilddrüse exprimiert wird (Amara et al., 1982). Es existieren

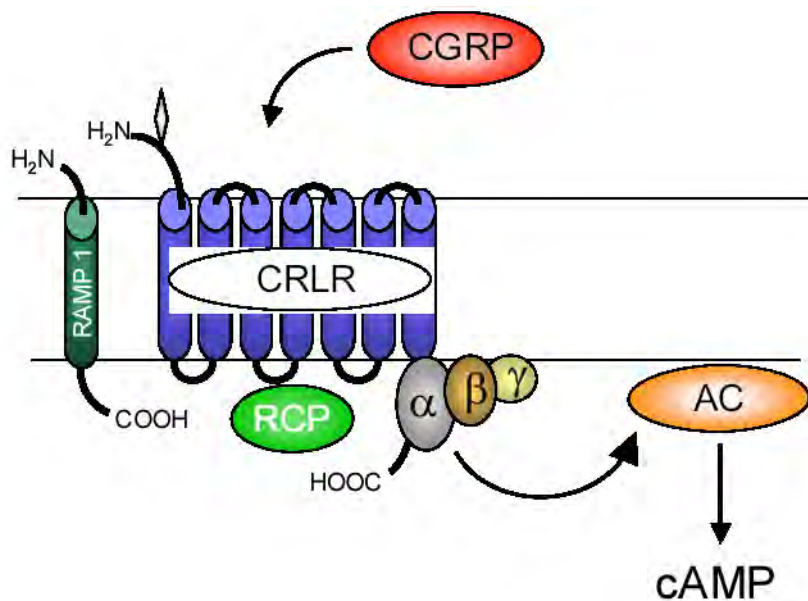
eine  $\alpha$ -Form und eine  $\beta$ -Form des Peptids, wobei das  $\beta$ -CGRP nicht vom Calcitonin-Gen stammt. Die Unterschiede zwischen den Formen bestehen in kleinen Abweichungen der Aminosäuresequenz. Zum Beispiel unterscheidet sich das  $\alpha$ -CGRP der Ratte in nur einer Aminosäure vom  $\beta$ -CGRP der Ratte (Wimalawansa, 1996). In somatosensorischen Nerven kommt hauptsächlich  $\alpha$ -CGRP vor, während im enterischen Nervensystem vorwiegend  $\beta$ -CGRP gefunden wird (Arulmani et al., 2004). In der cranialen Dura mater der Katze und der Ratte wurden ca. 20% CGRP-immunoreaktive Fasern gefunden (Messlinger et al., 1993).

**$\alpha$ -CGRP (Ratte): Ser-Cys-Asn-Thr-Ala-Thr-Cys-Val-Thr-His-Arg-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Asp-Asn-Phe-Val-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Glu-Ala-Phe-NH<sub>2</sub>**

**Abbildung 2:** Aminosäuresequenz des  $\alpha$ -CGRP Moleküls

CGRP moduliert physiologische Prozesse. Es hat z.B. Einfluss auf den coronaren Blutfluss und die mikrovaskuläre Permeabilität. Eine Hauptwirkung aller CGRP-Moleküle ist die langanhaltende, starke Vasodilatation von Arterien und Venen. Ein Großteil der CGRP enthaltenden sensiblen Afferenzen in der Dura mater encephali verläuft mit größeren Blutgefäßen. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten, dass die freien Nervenendigungen dieser Neurone oftmals in der Umgebung von größeren und kleineren Arterien liegen (Messlinger et al., 1993). Alle Nervenfasern, die CGRP enthalten, gehören zu den C- und A <sub>$\delta$</sub> -Fasern. Stimulation des Ganglion trigeminale oder der trigeminalen Nerven mit antidromer Erregung führt zur Freisetzung von CGRP, das im venösen Blut der Probanden nachgewiesen werden konnte (Edvinsson, 2004).

Die Rezeptoren der Calcitonin-Familie gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bestehen aus mehreren Untereinheiten, die die Selektivität der Rezeptoren bewirken. Es gibt drei Komponenten bei dieser Rezeptorfamilie, die für die Funktionsfähigkeit wichtig sind. Der *calcitonin-receptor* (CTR) oder der *calcitonin-receptor-like receptor* (CRLR oder CL) bildet die Grundstruktur des Heteromers. Dazu kommen die *receptor activity-modifying proteins*, die sogenannten RAMPs. Die dritte bedeutsame Komponente bildet das *receptor component protein* (RCP). Jeder Komponente obliegen andere Aufgaben. Die RAMPs sind Signalpeptide und für die Spezifität des Rezeptors zuständig (McLatchie et al., 1998). Einzige Ausnahme ist hier der CTR, der Calcitonin ohne die RAMP Komponente bindet (Muff et al., 1999). Zusammen mit RAMP 1, 2 oder 3 bildet der CTR Amylin-Rezeptoren. Wird CL mit RAMP-1 coexprimiert, dann bildet sich der CGRP<sub>1</sub>-Rezeptor aus. Kombiniert mit RAMP-2 oder RAMP-3 entsteht der Adrenomedullin-Rezeptor (Poyner et al., 2002). Das RCP-Polypeptid ist für die Aktivierung der Signaltransduktionskette des G-Proteins mit der Adenylatcyclase zuständig (Arulmani et al., 2004).



**Abbildung 3:** Rezeptoraufbau des G-Protein-gekoppelten CGRP<sub>1</sub>-Rezeptors: CRLR / CL: calcitonin-receptor-like receptor, RAMP 1: receptor activity-modifying protein 1, RCP: receptor component protein, AC: Adenylatcyclase. Wirkung von CGRP über Bindung an die CLRL Komponente, Signalweiterleitung über das G-Protein auf die Adenylatcyclase und die Bildung von cAMP (Vater, 2004).

Bis zur Aufklärung der molekularen Struktur der CGRP<sub>1</sub>-Rezeptoren wurden die CGRP-Rezeptoren in zwei Klassen unterteilt. Diese Einteilung basierte auf der antagonisierenden Wirkung des Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> und der agonistischen Aktivierung des Rezeptors durch ein analoges CGRP Molekül. Die Klasse der CGRP<sub>1</sub>-Rezeptoren ist sensitiver für CGRP<sub>8-37</sub> ( $pA_2 \geq 7$ ) und das Analogon (Cys(ACM)<sup>2,7</sup>) $\alpha$ -CGRP hat eine geringere Affinität für diese Rezeptoren. Es könnte sich hier um einen selektiven CGRP<sub>2</sub>-Rezeptor Agonisten handeln (Dennis et al., 1989). Die genauen Komponenten des CGRP<sub>2</sub>-Rezeptors konnten noch nicht identifiziert werden. Es existieren jedoch verschiedene Theorien über den Ursprung dieser CGRP<sub>2</sub>-Rezeptoren, so könnte es sich auch um verschiedenste

Rezeptoren handeln, die eine geringe Affinität für CGRP aufweisen (Poyner et al, 2002, Hay et al, 2007).

Experimente bei Migränepatienten zeigten, dass intravenöse Infusionen von CGRP über 20 Minuten prolongierte Kopfschmerzen und Migräneanfälle auslösen können (Lassen et al., 2002). Goadsby und Edvinsson (1990) fanden einen Anstieg der CGRP-Werte im venösen Blut der Venae jugularis und cubita bei Patienten während eines Migräneanfalls (Goadsby et al., 1990). In kürzlich veröffentlichten Untersuchungen wurde allerdings bezweifelt, dass es zu dieser Erhöhung kommt, da die Untersuchungsergebnisse nicht bestätigt werden konnten (Tvedskov et al., 2005). Jedoch gibt es einen neuen bekräftigenden Hinweis, der für die enge Beziehung zwischen CGRP-Wirkung und Migräneschmerz spricht: Hochaffine CGRP-Rezeptorantagonisten wie die neue Substanz BIBN4096BS sind bis zu sechs Stunden nach der Gabe bei Migräneanfällen therapeutisch wirksam (Olesen et al., 2004).

### **1.4 In-vitro Modelle in der Elektrophysiologie**

Das superfundierte Haut-Nervenpräparat der Ratte ist ein lange etabliertes Präparat für elektrophysiologische Ableitungen von afferenten Nervenfasern der Haut. Der Nervus saphenus und ein Stück der innervierten Hinterpfotenhaut werden dabei in einer speziellen Kammer mit der Coriumseite nach oben aufgespannt und mit synthetischer interstitieller Lösung (SIF) (Bretag, 1969) überspült. Das proximale Nervenende wird mit Paraffinöl bedeckt und in einzelne Filamente aufgetrennt, bis Einzelfaseraktivität abgeleitet werden kann. Um das rezeptive Feld der Nervenfasern isoliert chemisch zu reizen, wird ein Metallring auf den entsprechenden Hautbezirk gesetzt und die Superfusionslösung im abgegrenzten Raum durch Testflüssigkeit ersetzt (Reeh, 1986), (Kress et al., 1992).

Ein weiteres in-vitro Präparat, um die Mechanismen zur Entstehung von visceralem Schmerz zu untersuchen, wurde in Anlehnung an das oben beschriebene Haut-Nerven-Präparat an der Kaninchenpleura entwickelt. Dabei wurde die parietale Pleura mit dem Nervus phrenicus und dem bindegewebigen Zentrum des Diaphragmas entnommen, in einem Gewebesbad eingespannt und der Nerv in Einzelfilamente aufgetrennt, welche zur Ableitung von Potentialen auf eine Metallelektrode gelegt wurden. Zur gezielten Applikation von thermischen und chemischen Reizen wurde ein Metallring auf die rezeptiven Felder in der Pleura gesetzt, um das applizierte Volumen zu begrenzen (Wedekind, 1997).

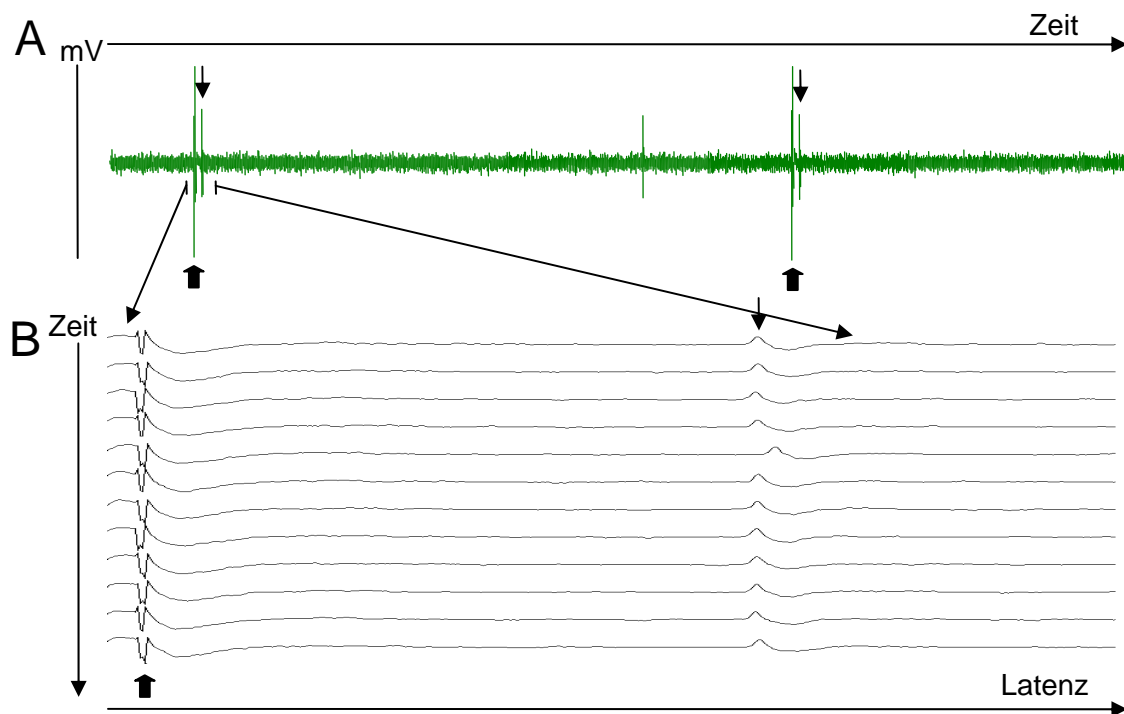
Das in dieser Arbeit verwendete in-vitro Präparat zur extrazellulären Ableitung von Afferenzen der Dura mater bei der Ratte (Schwenger et al., 2007) wird in den Methoden (3.3) beschrieben.

### **1.5 „Marking“-Methode aus der Mikroneurographie**

Mit der Methode der Mikroneurographie können Nervenfasern bei Probanden oder Patienten elektrophysiologisch untersucht werden. Dazu wird eine Mikroelektrode in den oberflächlichen Ast eines Nerven, zum Beispiel des Nervus peroneus am Fibulaköpfchen, gestochen, die Referenzelektrode in die benachbarte Haut. Über die Ableitelektrode werden schwache Strompulse abgegeben, um die Elektrodenspitze nahe an ein Remak-Bündel oder eine Einzelfaser im Nerv zu platzieren. Der Proband empfindet dann je nach Modalität der erregten Nervenfasern taktile oder noxische Reize. Nun wird über dieselbe Elektrode die natürliche Aktivität der Nervenfasern abgeleitet und im Innervationsgebiet des Nerven durch elektrische oder mechanische Reize das rezeptive Feld der afferenten Fasern aufgesucht. Mit einer implantierten Reizelektrode können dann die Fasern intracutan für längere Zeit repetitiv stimuliert werden (Weidner et al., 2000).

Bei gleichmäßiger, repetitiver elektrischer Reizung zeigen die Nervenfasern eine konstante Leitungslatenz. Sie ist für jede Faser charakteristisch. Wird die Aktivität durch natürliche oder elektrische Reize verstärkt, leiten die Fasern langsamer, was durch eine erhöhte Leitungslatenz sichtbar wird (Schmidt et al., 2002). Die Leitungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der vorausgegangenen Aktivität. Dieses Phänomen wird bei der sogenannten „Marking“-Technik zur Untersuchung der abgeleiteten Nervenfasern angewandt, indem man die Latenz der Faser verfolgt, während sie mit niedriger Frequenz (meist 1-2 Hz) repetitiv elektrisch stimuliert wird. Der Zeitverlauf der Latenz nach dem elektrischen Stimulus wird in einem gesonderten Fenster auf dem Bildschirm dargestellt und in Echtzeit verfolgt (Schmelz et al., 2003). Somit wird jede Latenzänderung aufgrund von Aktivität oder anderen Einflüssen, zum Beispiel erhöhte Temperatur, beobachtet und aufgezeichnet. Bei zunehmenden Latenzänderungen unter Aktivität (Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit) spricht man von *Slowing*, während man bei Latenzzeitverkürzung unter Aktivität (Erhöhung der Leitungsgeschwindigkeit) von *Speeding* spricht.

Diese Technik ermöglicht eine kontinuierliche Beobachtung von Nervenfasern, die über mehrere Stunden abgeleitet werden können. Bei Mehrfaserableitungen können einzelne Fasern durch die Leitungslatenz eindeutig voneinander getrennt werden. Afferente Fasern, die nicht mechanisch sensitiv sind, können dabei ebenso erfasst werden wie sympathische Efferenzen, welche zufällig in dem abgeleiteten Nervenfaserbündel laufen (Schmelz et al., 1995).



**Abbildung 4:** A: Elektrophysiologische Ableitung einer Faser und Darstellung im horizontalen Verlauf mit Reizimpuls (dicker Pfeil) und Reizantwort (dünner Pfeil). B: Der vergrößerte Abschnitt zeigt den Latenzverlauf des Aktionspotentials, dargestellt mit der Marking-Technik, vertikaler Zeitverlauf.

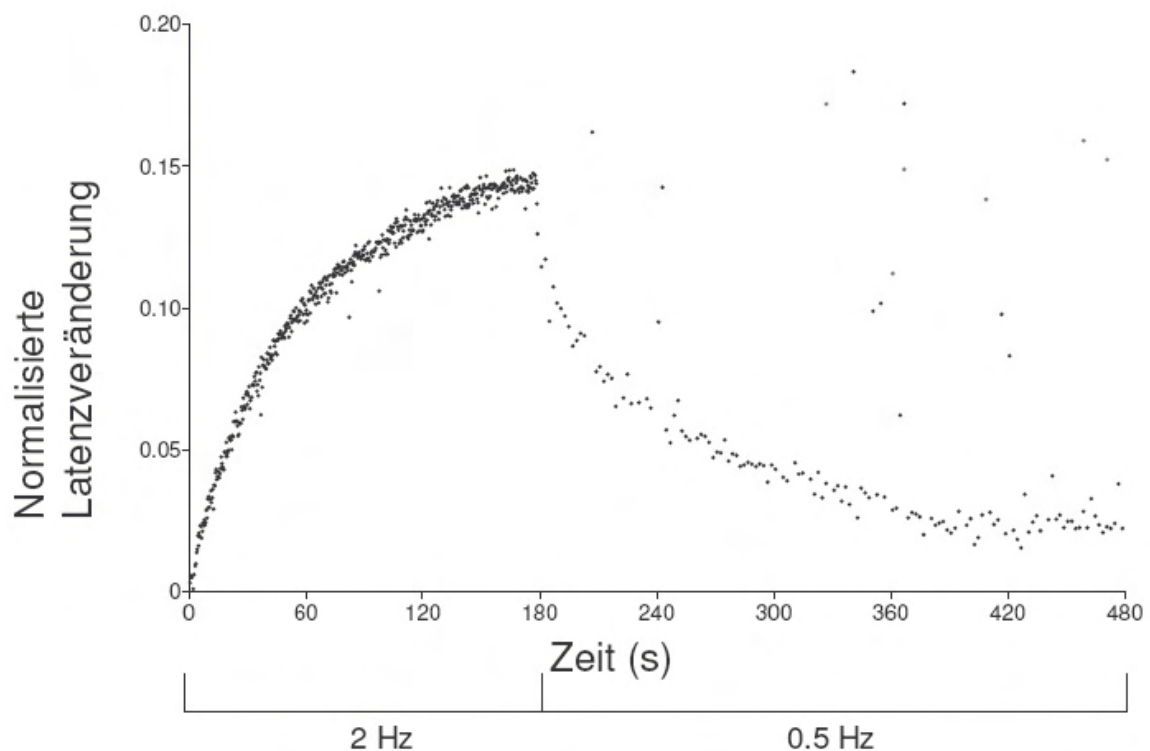
### 1.6 Aktivitätsinduzierte Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing)

Das Slowing wird auch genutzt, um aktivitätsinduzierte Leitungseigenschaften der abgeleiteten Nervenfasern genauer zu beschreiben. Dazu wird ebenfalls repetitiv elektrisch gereizt, und zwar mit einer höheren Frequenz als bei der Marking-Technik (Bereich 2-10 Hz), und das Verhalten der Latenz aufgezeichnet. Mit jedem auf den Reizimpuls antwortenden Aktionspotential wird die Laufzeit der Aktionspotentiale weiter verzögert, so dass sich die Leitungsgeschwindigkeit verlangsamt. Dies setzt sich bis zu einem Maximalwert (Plateau) fort. Wird die Reizfrequenz erniedrigt, beschleunigt sich die Leitungsgeschwindigkeit wieder. Dieses



Phänomen ist besonders typisch für Neuronen mit unmyelinisierten Axonen (Thalhammer et al., 1994).

Campero et al. zeigten 2004, dass humane sympatische Fasern anhand ihres charakteristischen Slowingprofils (bei 2 Hz für 180 Sek) von afferenten C-Fasern zu unterscheiden sind. Die efferenten Fasern zeigen außerdem typischerweise eine hohe Spontanaktivität. Anhand ihrer Ergebnisse zeigten sie, dass dieses elektrophysiologische Kriterium zur Identifikation von sympatischen Fasern verwendet werden kann (Campero et al., 2004).



**Abbildung 5:** Beispiel eines Latenzverlaufes einer Nervenfasern unter elektrischer Stimulation der Faser für 180 Sekunden mit 2 Hertz und anschließender Stimulation für 300 Sekunden bei 0,5 Hertz. Der zeitliche Verlauf wird auf der X-Achse abgebildet. Unter elektrischer Reizung mit 2 Hz verlängert sich die Latenzzeit der Faser (Y-Achse, normalisiert). Wird die Reizfrequenz reduziert, kehrt die Latenz zum Ursprungswert zurück.

Die aktivitätsabhängige Änderung der Leitungsgeschwindigkeit wird klassischerweise der Nachhyperpolarisation der axonalen Membran zugeschrieben, die durch eine verstärkte Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  verursacht werden könnte (Weidner et al., 2000). Die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  transportiert Natriumionen aus der Zelle und Kaliumionen in die Zelle. Durch die schnell aufeinander folgenden Aktionspotentiale würde das intrazelluläre Natrium ansteigen und die Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  erhöhen. Die Axonmembran würde hyperpolarisieren. Die dadurch benötigte Ladung und damit die Zeit, die nötig wäre, um ein weiteres Aktionspotential auslösen zu können, würde ansteigen. Somit käme es zu der Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing).

Eine kürzlich veröffentlichte Publikation unserer Arbeitsgruppe zeigt dagegen, dass die Hyperpolarisation nicht die Ursache sein kann (de Col et al., 2008). Durch die Substanz Ouabain (Gift der Pflanze *Strophanthus gratus*) wurde die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  blockiert und somit die Hyperpolarisation vermindert. Wäre die Hyperpolarisation die direkte Ursache für die Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit, dann wäre unter Ouabain zu erwarten, dass der Maximalwert des Slowing während der repetitiven Stimulation reduziert ist. Es kommt jedoch zu einer Verstärkung des Slowing, d.h. die Leitungslatenz erreicht einen deutlich höheren Maximalwert.

Während repetitiver Aktivität hyperpolarisiert die Nervenfasermembran. Diese Änderungen beeinflussen den Zustand, in dem sich die spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle befinden. Während des Aktionspotentials kommt es zu einer Konformationsänderung der Kanäle. Sie gehen von „geschlossen-aktivierbar“ über „offen-aktiviert“ in den kurzen Zustand „geschlossen-inaktiviert“ über, was weitgehend die Refraktärperiode einer Nervenfaser bedingt. Neben dem kurzen geschlossen-inaktivierten Zustand (im Bereich von Millisekunden) gibt es allerdings einen zweiten mit langer Zeitkonstante (im Sekundenbereich),

den sog. „langsamen inaktiven Zustand“, d.h. ein Teil der Natriumkanäle bleibt länger inaktiviert (Ogata and Tatebayashi, 1992).

Gesteigerte Aktivität (höhere Aktionspotentialfrequenz) sorgt dafür, dass die Anzahl der Kanäle, die in den langsamen inaktiven Zustand übergehen, erhöht wird. Die unter Aktivität entstehende Hyperpolarisation verkürzt andererseits die Zeit, in der die Kanäle im inaktivierten Zustand sind. Ouabain blockiert die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  und hemmt die Hyperpolarisation. Dadurch verlängert sich der inaktive Zustand der Kanäle und es stehen beim nächsten Reiz weniger Kanäle zur Verfügung. Somit müsste sich die Leitungsgeschwindigkeit verlangsamen, was tatsächlich der Fall ist. Demnach ist es in erster Linie die Verfügbarkeit der aktivierbaren  $\text{Na}^+$ -Kanäle, die die axonale Leitungsgeschwindigkeit bestimmt (de Col et al., 2008).

### 1.7 Aufgabenstellung

Das sensorische Neuropeptid Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) wird von einem großen Teil der afferenten Neurone exprimiert, welche intrakranielle Strukturen wie die Dura mater encephali und Hirngefäße innervieren. Es ist bekannt, dass noxische Reizung dieser Strukturen Kopfschmerzen verursacht. Die dafür verantwortlichen nozizeptiven Afferenzen verlaufen in einem Ast des Nervus trigeminus und lassen sich im Dura-Nervenpräparat ableiten und untersuchen.

Folgende Fragestellungen wurden in den in-vitro Experimenten am Halbschädelparäparat der Ratte untersucht:

1. Untersuchung der Eigenschaften trigeminaler Afferenzen der Dura mater aus einem meningealen Ast (Nervus spinosus) des Nervus trigeminus. Kann anhand dieser Ableitungsmethode bestätigt werden, dass es sich um polymodale Afferenzen handelt und welchen Anteil tragen in dieser Gruppe thermo- und mechanosensitive Fasern?
2. Wirkung des Neuropeptids CGRP auf die Aktivierung trigeminaler Afferenzen. Hat superfundiertes CGRP Einfluss auf die Spontanaktivität der Afferenzen in der Dura mater?
3. Beteiligung von CGRP-Rezeptoren bei der Aktivierung trigeminaler Afferenzen. Welchen Einfluss hat der Rezeptorantagonist CGRP<sub>8-37</sub>?
4. Wirkung von CGRP auf die Leitungseigenschaften trigeminaler Afferenzen. Hat CGRP einen Einfluss auf die aktivitätsinduzierte Änderung der Leitungsgeschwindigkeit?

5. Wird ein Effekt von CGRP auf die Änderung der aktivitätsinduzierten Leitungsgeschwindigkeit durch andere Substanzen (CGRP<sub>8-37</sub> und Glibenclamid) beeinflusst und kann man daraus auf den möglichen Mechanismus einer CGRP-Wirkung schließen?

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Lösungen

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Bezugsquelle
Agar-Agar Kobe 1	Roth, Karlsruhe
Carbogen (95% O <sub>2</sub> und 5% CO <sub>2</sub> )	Linde, Wiesbaden
$\alpha$ -CGRP, Ratte	Neosystem, Frankreich
CGRP-I <sub>8-37</sub> , Human	Calbiochem, Darmstadt
Capsaicin	Sigma, Taufkirchen
Glibenclamid	Sigma, Taufkirchen

#### Synthetische interstitielle Lösung (SIF):

Natriumchlorid (> 99%)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid ( $\geq 99,5\%$ )	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat ( $\geq 99,5\%$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat- Dihydrat ( $\geq 98\%$ )	Roth, Karlsruhe
Natrium-Gluconat	Roth, Karlsruhe
$\alpha$ -D(+)-Glucose Monohydrat ( $\geq 99,5\%$ )	Roth, Karlsruhe
D-(+)-Saccharose ( $\geq 99,5\%$ )	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid Dihydrat ( $\geq 99\%$ )	Roth, Karlsruhe

Alle Substanzen wurden als Stammlösungen aufbewahrt und vor jedem Experiment bis zur benötigten Konzentration verdünnt. Die Stammlösungen wurden mit Aqua dest. angesetzt, Ausnahme waren Capsaicin und Glibenclamid. Hier wurde die Stammlösung mit DMSO angesetzt.

### 2.1.2 Lösungen

**Agar-Agar-Lösung (0,54%) zur Gewebeeinbettung.** In 10 ml SIF wurden 0,54 g pulverisiertes Agar-Agar eingerührt und in einem Becherglas auf einer Heizplatte bis zum Siedepunkt (95°C) erhitzt.

**CGRP-Testlösung.** Ansatz 1: In 10 ml Aqua dest. wurden 3,806 mg pulverförmiges CGRP gelöst, um eine  $10^{-4}$  M Stammlösung herzustellen. Je 230 µl der Stammlösung wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und bei -20°C tiefgefroren.

Ansatz 2: In 10 ml Aqua dest. wurden 0,381 mg pulverförmiges CGRP gelöst und so eine  $10^{-5}$  M Stammlösung hergestellt. Die Stammlösung wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße mit je 250 µl aufgeteilt und diese tiefgefroren.

Vor jedem Experiment wurden die Substanzen bei Zimmertemperatur aufgetaut und die benötigte Menge in 20 ml SIF pipettiert. Zuvor wurde die gleiche Menge SIF von der Lösung abpipettiert, die dann mit dem CGRP wieder dazu gegeben wurde.

**CGRP<sub>8-37</sub>-Testlösung.** Zum Herstellen einer  $10^{-4}$  M Stammlösung wurden in 20 ml SIF 3,13 mg pulverförmiges CGRP<sub>8-37</sub> gelöst. Die Stammlösung wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße portioniert, tiefgefroren und vor dem Versuch bei Zimmertemperatur aufgetaut.

**CGRP<sub>8-37</sub>/CGRP-Testlösung** Für diese Lösung wurde zuerst eine  $10^{-6}$  M CGRP<sub>8-37</sub>-Testlösung hergestellt, in die dann noch 200 µl CGRP  $10^{-5}$  M pipettiert wurde, um eine CGRP-Konzentration von  $10^{-7}$  M zu erreichen.

**Capsaicin-Testlösung.** Eine  $10^{-3}$  M Stammlösung wurde 1:1000 verdünnt, so dass eine  $10^{-6}$  M Testlösung entstand.

**Glibenclamid-Testlösung.** Für die Stammlösung wurden 9,88 mg Glibenclamid in 2 ml DMSO gelöst und in Eppendorf Reaktionsgefäße zu je 60 µl pipettiert. Diese Cups wurden dann tiefgefroren bei -20°C.

**SIF-Lösung zur Gewebesuperfusion.** Für 100 ml SIF Lösung wurden 100 ml entmineralisiertes Wasser mit 0,63 g Natriumchlorid (107,8 mM), 0,023 g Kaliumchlorid (3,50 mM), 0,017 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat (0,69 mM), 0,22 g Natriumhydrogencarbonat (26,20 mM), 0,026 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (1,67 mM), 0,21 g Natrium-Gluconat (9,64 mM), 0,10 g  $\alpha$ -D(+)-Glucose Monohydrat (5,55 mM) und 0,26 g D-(+)-Saccharose (7,60 mM) mit einem Magnetrührer vermischt. Die Lösung wurde für zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mit Carbogen begast. 0,0225 g Calciumchlorid Dihydrat (1,53 mM) wurden der Lösung noch beigefügt, auf dem Magnetrührer gelöst und die Lösung nochmals mit Carbogen begast.

## 2.2 Geräte und Laborbedarf

### 2.2.1 Elektrophysiologische Versuchsanordnung

Verstärker: Axopatch 200A	Axon Instruments, U.S.A
Analog-Digital-Wandler:	
Micro 1401UK	Cambridge Electronic Design, UK
Temperaturfühler	Eigenbau, Universität Erlangen
Heiz-/Kaltthermode	Eigenbau, Universität Erlangen
Heizelement	Eigenbau, Universität Erlangen
Schlauchpumpe (OEM Antrieb, Pumpenköpfe, Schläuche)	Watson Marlow, Rommerskirchen
Elektr. Stimulator:	
Stimulus Isolator A360	WPI, U.S.A.
Reizelektrode	Eigenbau, Universität Erlangen
Micromanipulator	Wagner, Schöffengrund/Wetzlar



### Mikroskop:

MZ FI III 1.6 PLAN APO 0,63x	Leica Microsystems, Wetzlar
Okulare: 10445111 10x/21B	Leica Microsystems, Wetzlar
Schläuche	Watson Marlow, Rommerskirchen
Plexiglaskammer	Eigenbau, Universität Erlangen
LED Lampe	Eigenbau, Universität Erlangen

### 2.2.2 Laborbedarf

#### Reaktionsgefäße:

Standard Reaktionsgefäße 3810	Eppendorf, Hamburg
Bechergläser (20 ml, 50 ml, 75 ml)	Schott, Wertheim
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Präparationsbesteck	Aesculap, Heidelberg
Glaspipetten: GB 150-8P	Science Products, Hofheim
Einmalspritzen (2 ml, 5ml, 10ml)	Braun, Melsungen
Einmalhandschuhe	Hartmann, Heidenheim

### 2.2.3 Sonstige Geräte

Heizplatte/Magnetrührer	Merck, Darmstadt
Wasserdemineralisierungsanlage	Millipore, Eschborn
pH-Meter	Bioblock Scientific, Frankreich
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Puller für Micropipetten	Sutter Instruments, U.S.A.

### 2.2.4 Software

Microsoft Word	Microsoft Corp., U.S.A.
Microsoft Excel	Microsoft Corp., U.S.A.
Igor Pro	Wavemetrics, U.S.A.

## Material

---

Statistica

Statsoft, U.S.A.

CorelDraw

Corel Corporation

Spike 2

Cambridge Electronic Design, UK

### **3      Methoden**

#### **3.1    Versuchstiere**

Die verwendeten Versuchstiere stammten aus dem Tierstall des Instituts für Physiologie und Pathophysiologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Es handelte sich um erwachsene, männliche Wistar-Ratten. In wenigen Fällen wurden weibliche Tiere für die Organentnahme verwendet. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 220 g und 400 g. Die Tiere wurden nach Geschlecht getrennt in Standardkäfigen gehalten und mit Futter und Wasser ad libitum versorgt. Art und Anzahl der Versuchstiere wurden dem Tierschutzbeauftragten der Universität und der zuständigen Tierschutzbehörde mitgeteilt.

#### **3.2    Durchführung der Schädelpräparation**

Die Ratten wurden durch Kohlendioxidinhalation getötet und danach durch einen Scherenschlag enthauptet. Das Fell wurde komplett abgezogen, die Augen entfernt und die Kopf- und Gesichtsmuskeln mit einem Skalpell am Cranium entlang abgetrennt. Der Arcus zygomaticus sowie die Mandibula am Caput mandibulae und am Processus coronoideus wurden auf beiden Seiten im Articulatio temporomandibularis mit einer Knochensplitterzange durchtrennt und entfernt. Das Palatinum molle wurde mit einer chirurgischen Pinzette von rostral aus abgezogen. Soweit möglich wurde die Muskulatur sowie die Schädelfaszie vom Knochen entfernt.

Im nächsten Schritt wurde mit einem spitzen Skalpell das Neuro- und Viscerocranium entlang der medianen Suturae capitis durchtrennt. Dabei wurde das Gehirn mittig geteilt. Das Gehirn und der Hirnstamm wurden mit Arachnoidea und Pia mater im Subduralspalt mit einem Raspatorium herausgelöst und die Gehirnnerven mit dem Skalpell durchtrennt.

Die Schädelhälften mit der intakten Dura mater wurden in oxygenierter physiologischer SIF-Lösung (pH 7,4) gelagert und während der restlichen Präparation immer wieder mit dieser befeuchtet. Der Schädel wurde rostral mit einer Knochenzange gekürzt und der extracranial gelegene Teil des Nervus trigeminus mit dem Skalpell abgetrennt.

Für jeden Versuch wurde eine Hälfte des Schädels verwendet. Die zweite Hälfte wurde bis zur Verwendung am selben Tag in oxygenierter physiologischer Lösung gelagert.

Die für den Versuch verwendete Schädelhälfte wurde mit Hilfe von Agar-Agar in eine speziell angefertigte Kammer aus Plexiglas eingebettet, in der sie mit physiologischer Lösung überspült werden konnte. Der Agar wurde dazu bis zum Siedepunkt (95°C) erhitzt und dann flüssig in die Kammer gegeben. Vor dem Erstarren des Agar wurde das Präparat bei einer Temperatur von ca. 40°C darin eingelassen. Die Schädelhöhle bildete damit den Boden des Gewebebades, das optisch so transparent war, dass sich bei Beleuchtung von unten auch feine Strukturen in der Dura mater abzeichneten.

Unter dem Mikroskop wurde die Radix sensoria des Nervus trigeminus mit dem Ganglion trigeminale von den umliegenden Strukturen freipräpariert und mit einer kleinen Federschere abgetrennt. Dabei wurden die drei Nervenäste des Nervus trigeminus, der Nervus ophthalmicus, der Nervus maxillaris und der Nervus mandibularis, durchtrennt.

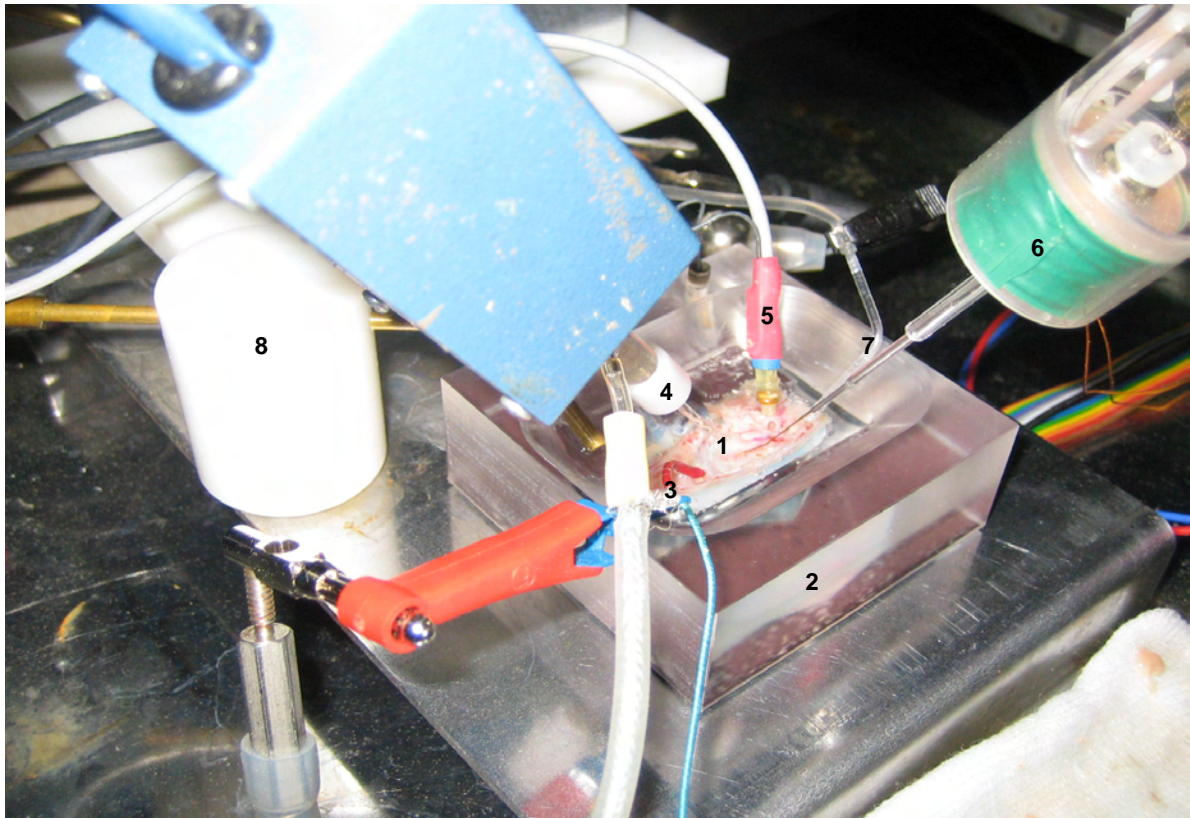
In der Fossa cranii wurde in der Dura mater verlaufend ein Nervenast sichtbar: der Ramus meningeus des Nervus mandibularis (Nervus spinosus siehe 1.1.). Dieser war beim Heraustrennen des Ganglion trigeminale an seiner Eintrittsstelle in die Radix sensoria durchschnitten worden. Mit Hilfe

von feinen Pinzetten wurde der Nerv ca. 1-2 mm aus der Dura mater herausgelöst.

### **3.3 Versuchsaufbau und elektrische Ableitung**

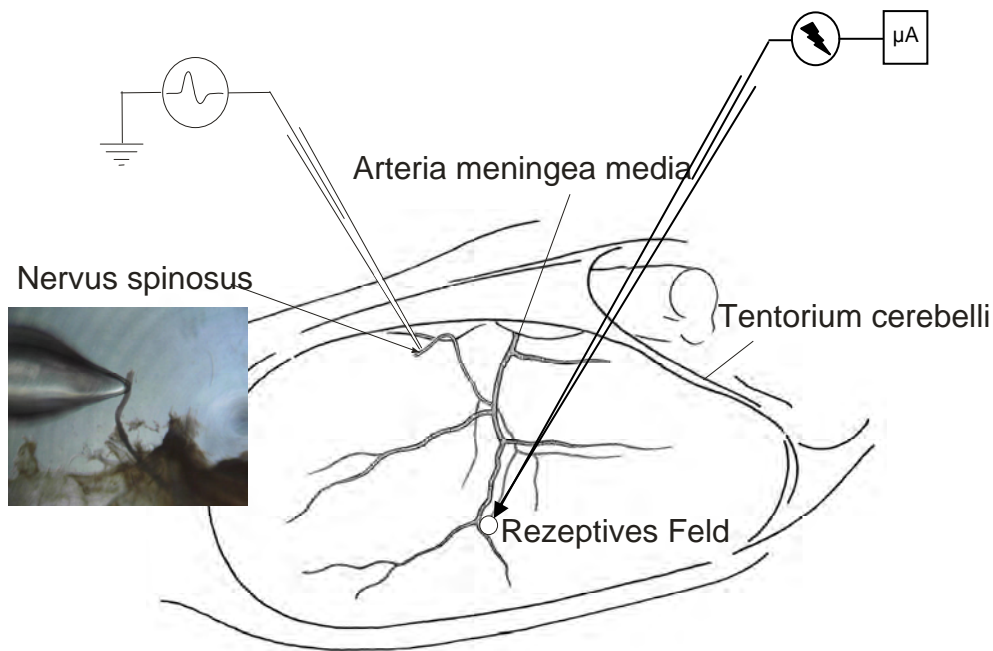
Der Versuchsaufbau mit Gewebebad, Flüssigkeitskreislauf, Reiz- und Ableitvorrichtung befand sich zur Abschirmung gegen Störfelder in einem Faradayschen Käfig. Zur Präparation und Beobachtung während der experimentellen Abläufe wurde ein Stereomikroskop mit Unter- und Auflichtsystem (Kaltlicht) verwendet.

Die in Agar eingebettete Schädelhälfte wurde in ihrem Gewebebad mittels eines Schlauchpumpensystems kontinuierlich mit physiologischer Lösung (SIF-Lösung) superfundiert. Die Gesamtflüssigkeitsmenge betrug im Gewebebad und in den zu- und abführenden Schläuchen ca. 11 ml, das Durchflussvolumen 4,4 ml/min. Es handelte sich um ein offenes Schlauchsystem, welches bei Bedarf zu einem in sich geschlossenen Kreislauf umgeschaltet werden konnte. Zu Beginn der Superfusion war der offene Kreislauf eingeschaltet. Die Flüssigkeit wurde in 1 Minute und 25 Sekunden durch den zulaufenden Schlauch in das Gewebebad gepumpt. Die Geschwindigkeit der Pumpe konnte programmiert geregelt werden. Kurz vor dem Gewebebad wurde der Zulauf durch ein ebenfalls programmiert geregeltes Peltier- Element geführt, das für die Erwärmung des Bades auf eine Temperatur zwischen 32° und 34°C sorgte. Durch einen unmittelbar am Gewebe installierten, rückkoppelnden Temperaturfühler wurde die Badtemperatur konstant gehalten (Schwankungsbreite < 0,2°C). Die physiologische Badlösung und alle verwendeten Lösungen wurden zur Stabilisierung des pH-Wertes während des gesamten Experimentes mit Carbogen begast.



**Abbildung 6:** Foto der Versuchsanordnung. Die Schädelhälfte (1) befindet sich in einem Plexiglasblock (2), eingebettet in Agar Agar und wird von physiologischer Lösung umspült. Im Bad befinden sich ein Temperaturfühler (3), die Ableitungselektrode (4) mit Erdungskabel (5) und die Reizelektrode (6). Die physiologische Lösung zirkuliert über Einlauf (7) und Auslauf (8) mittels eines Schlauchpumpensystems.

Für die extrazelluläre Ableitung von Afferenzen des Nervus spinosus wurden mit einem horizontalen Puller Mikropipetten aus Borat-Glas (Außendurchmesser 1,5 mm, 80 mm Länge) gezogen, so dass die Öffnungsweite der Spitze etwa 10-30  $\mu\text{m}$  betrug. Der freigelegte Nervus spinosus wurde möglichst proximal von der Seite an die Spitze der Ableitelektrode angesaugt. Der Unterdruck wurde durch eine Spritze über einen mit dem Pipettensystem verbundenen abklemmbaren Schlauch aufrecht erhalten. Die Ableitstelle am Nerv wurde so lange verändert, bis eine stabile Antwort messbar war. Die Gegenelektrode (Anode) bestand aus einem Ag-AgCl-Pellet in der Badflüssigkeit.



**Abbildung 7:** Schematische Skizze des Versuchsaufbaus: An dem durchtrennten Nervus spinosus befindet sich die Ableitungselektrode mit der Pipette, an die der Nerv mittels Unterdruck fixiert wird (siehe Foto links). Die Reizelektrode befindet sich im rezeptiven Feld im Bereich der freien Nervenendigung.

Rezeptive Felder in der Dura wurden durch mechanische Stimulation mit von-Frey-Filamenten (9 mN Stärke), seltener durch elektrische Stimulation aufgesucht. Das rezeptive Feld wurde definiert als der Bereich der Nervenfasern, der sich mechanisch oder elektrisch reizen ließ. Bei elektrischer Stimulation war nicht zu unterscheiden, ob es sich um eine Nervenendigung oder ein Axon handelte. Durch systematisches Absuchen der Dura mater nach rezeptiven Feldern, insbesondere entlang der Verzweigungen der Arteria meningea media, entstand eine Übersicht der ableitbaren Fasern. Zur elektrischen Reizung im rezeptiven Feld wurde eine selbst konstruierte Reizelektrode aus zwei unterschiedlich langen feinen Drähten verwendet, wobei lediglich die Kathode (der längere Draht) mit minimalem Druck auf die Dura aufgesetzt wurde. Mit einer Konstantstromquelle wurden elektrische Reize von 2-100  $\mu\text{A}$  und einer Pulsbreite von 1 ms appliziert.

Die Aktivität von bis zu zehn Nervenfasern wurde gleichzeitig abgeleitet. Durch konstante elektrische Stimulation im rezeptiven Feld einer Nervenfaser wird die Beobachtung und Aufzeichnung der Aktionspotentiale einer einzelnen Faser möglich. Es handelte sich somit bei dieser Methode um eine extrazelluläre, funktionelle Einzelfaserableitung. Auf jeden elektrischen Impuls als adäquaten Reiz folgte ein Aktionspotential der Nervenfaser. Dieses trat bei Stimulation mit konstanter Pulsfrequenz und Pulsbreite mit einer gleichbleibenden Latenzantwort auf. Es wurden Axone verwendet, die keine oder nur eine sehr geringe Spontanaktivität zeigten. Im Experiment wurde der Latenzverlauf der Faser verfolgt. Man nutzte hierbei die Eigenschaft, dass eine Änderung der elektrischen Membraneigenschaften zu einer Änderung der Leitungsgeschwindigkeit und damit der Latenzzeit führt. Die Änderungen der elektrischen Membraneigenschaften wurden durch zusätzliche Aktivität der Faser, durch Änderungen der Temperatur oder durch Wirkungen von Substanzen (über Zellmembranstrukturen wie z.B. Ionenkanäle) vermittelt.

Die Signale wurden verstärkt und gefiltert, über einen Analog-Digital-Wandler digitalisiert und in Echtzeit zusammen mit den Reizparametern, der Badtemperatur und den Kommentaren gespeichert. Zur Echtzeit-Beobachtung des Versuchs wurde das Programm Spike 2 verwendet.

### **3.4 Klassifizierung und Charakterisierung der Nervenfasern**

Die Klassifizierung der Nervenfasertypen erfolgte anhand der Leitungsgeschwindigkeit. Die Leitungsgeschwindigkeit der Nervenfasern wurde durch die Anfangslatenz und den Abstand zwischen dem Ort der elektrischen Stimulation (rezeptives Feld) und dem Ableitort am Nerv berechnet.



Die Nervenfaserklassen wurden nach der Klassifizierung von Erlanger/Gasser eingeteilt in:

- dicke markhaltige  $A_{\alpha/\beta}$ -Fasern mit Leitungsgeschwindigkeiten von über 30 m/s
- dünne markhaltige  $A_{\delta}$ -Fasern mit Leitungsgeschwindigkeiten von 2-30 m/s
- marklose C-Fasern mit Leitungsgeschwindigkeiten von  $\leq 2$  m/s

Des Weiteren wurden die abgeleiteten Nervenfasern anhand ihres Verhaltens auf verschiedene Reize (Temperaturveränderung: Wärme und Kälte, Mechanosensibilität, Capsaicin-Sensibilität und aktivitätsabhängige Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit – Slowing, s.u.) charakterisiert, um innerhalb der Faserklasse die Eigenschaften der Fasern näher zu beschreiben.

### 3.4.1 Temperaturreiz

Um zu überprüfen, ob die afferenten Fasern durch thermische Reize aktiviert werden können, wurde die Dura mater über die Veränderung der Badtemperatur gekühlt und/oder erwärmt. Die Badtemperatur wurde dabei über das Peltier-Element kontinuierlich mit  $\pm 0,1^{\circ}\text{C/s}$  bis ca.  $12 - 18^{\circ}\text{C}$  erniedrigt und bis  $48^{\circ}\text{C}$  erhöht.

### 3.4.2 Mechanische Druckreize mit von-Frey-Filamenten

Zur Feststellung der mechanischen Schwelle der Nervenfasern wurden Druckreize im rezeptiven Feld mit einer Reihe verschieden starker von-Frey-Filamenten appliziert, die zuvor auf einer Feinwaage geeicht worden waren. Der definierte Druck der verwendeten Filamente entsprach 0,1 mN, 0,3 mN, 0,7 mN und 0,9 mN. Dabei wurde das von-Frey-Filament unter leichtem

Druck (leichte Biegung des Filaments) für ca. 1 Sekunde in das rezeptive Feld der Faser gesetzt.

### 3.4.3 Chemischer Reiz durch Capsaicin

Für die chemische Stimulation wurde eine Capsaicin-Lösung in der Konzentration  $10^{-6}$  M in das System eingewaschen. Die Superfusionslösung wurde durch Zumischung entsprechender Mengen aus einer Stocklösung von Capsaicin in DMSO ( $10^{-3}$  M) frisch hergestellt. Die Capsaicin-Gabe war stets der letzte Reiz, um die Beeinflussung nachfolgender Antworten auszuschließen. Je nach Reaktion der abgeleiteten Faser wurde nach 30 Sekunden bis 5 Minuten die Capsaicin-Superfusion gestoppt und das Experiment beendet.

### 3.4.4 Aktivitätsinduzierte Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing)

Das Slowingprofil wurde zur weiteren Charakterisierung der Afferenzen bestimmt. Nach einer fünfminütigen Pause ohne elektrische Stimulation folgte eine Aktivierungsphase für drei Minuten bei einer Reizfrequenz von 2 Hz. Die nachfolgende Erholungsphase bei 0,5 Hz Stimulationsfrequenz dauerte 5 Minuten. Das Stimulationsprotokoll wurde über das Spike 2-System programmiert gesteuert.

### 3.5 Versuchsprotokolle

#### 3.5.1 Experimente mit Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)

**Vorversuche zur Bestimmung der effektiven Konzentrationen von CGRP.** Bei diesen Experimenten wurde untersucht, ob CGRP erregend auf meningeale Afferenzen wirkt. Die Vorversuche dienten dazu, die wirksame Konzentrationen von CGRP zu bestimmen. Dafür wurden meningeale Afferenzen mit stabiler Reizantwort mit Hilfe der Protokolle „Slowing“ und „Temperatur“ charakterisiert. Anschließend wurde das Gewebe mit ansteigenden Konzentrationen von CGRP (gelöst in SIF) superfundiert.

Protokoll				
Slowing	Temperatur	CGRP		
		$10^{-11}$ M		
		$10^{-10}$ M		
		$10^{-9}$ M		
		$10^{-8}$ M		
		$10^{-7}$ M		
		$10^{-6}$ M	Mechan. Reiz	Capsaicin

**Tabelle 1:** Zusammenfassung des Protokolls der Vorversuche in zeitlicher Abfolge mit dem Slowing-Protokoll beginnend, es folgten die Temperaturkurve, die CGRP Stimulationen, die mechanische Testung und die Capsaicinstimulation. Die einzelnen Superfusionsschritte mit CGRP wurden in aufsteigender Konzentrationsreihe ( $10^{-11}$  M -  $10^{-6}$  M) getrennt durch Spülphasen durchgeführt.

CGRP wurde in jeder Konzentration für 10 Minuten superfundiert und danach das Gewebe jeweils 10 Minuten lang mit reinem SIF gespült. Nach der höchsten CGRP-Konzentration und 15 Minuten Spülung folgte ein mechanischer Test. Dazu wurde die Nervenfasern in ihrem rezeptiven Feld durch von-Frey-Filamente in aufsteigender Stärke stimuliert. Wenn nach der mechanischen Manipulation die Faser noch bei gleicher Latenz erregt

werden konnte, wurde das Gewebe mit Capsaicin (1  $\mu\text{M}$ ) für höchstens 5 Minuten (oder bis die Faser aktiviert wurde) superfundiert. Während der gesamten Versuchsdauer (ausgenommen Slowing-Protokoll) wurden die untersuchten Nervenfasern mit einer Reizfrequenz von 0,5 Hz elektrisch stimuliert, um Abweichungen ihrer Leitungslatenz zu erkennen, wobei eine sprunghaft ansteigende Latenz ein empfindlicher Parameter für Aktivierung darstellte.

**Hauptversuche zur CGRP-Wirkung.** Diese Experimente dienten dazu, den Anteil der durch CGRP aktivierten Afferenzen und einige ihrer funktionellen Eigenschaften zu bestimmen. Nach den Charakterisierungsschritten „Slowing“ und „Temperatur“ wurde CGRP ( $10^{-8}$  M) für 15 bis 20 Minuten superfundiert. An die Spülphase mit SIF (10 min) schlossen sich der mechanische Test und die Superfusion mit Capsaicin an. Eine zweite Versuchsreihe wurde mit der CGRP-Konzentration von  $10^{-7}$  M durchgeführt. Die Reizfrequenz bei diesen Versuchen lag bei 0,5 Hz.

Protokoll					
			CGRP		
Teil A	Slowing	Temperatur	$10^{-8}$ M	Mechan. Reiz	Capsaicin
Teil B	Slowing	Temperatur	$10^{-7}$ M	Mechan. Reiz	Capsaicin

**Tabelle 2:** Überblick über das Protokoll der Hauptversuche aufgeteilt in Teil A mit der CGRP Konzentration  $10^{-8}$  M und Teil B mit der CGRP Konzentration  $10^{-7}$  M. Die weiteren Schritte entsprechen den in Tabelle 1 erläuterten Abfolgen.

### 3.5.2 Experimente mit aktivitätsinduzierter Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing) unter CGRP, CGRP<sub>8-37</sub> und Glibenclamid

**Slowing unter Superfusion mit CGRP.** Bei diesen Experimenten wurde die Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit unter Aktivität (Slowing) gemessen und untersucht, ob CGRP das aktivitätsinduzierte Slowing beeinflusst. Zuerst wurde die Referenzkurve für den Verlauf des Slowing der jeweiligen Faser erstellt, dann folgte die Charakterisierung mit dem Temperaturprotokoll. Für die Superfusion wurde die hohe Konzentration von CGRP ( $10^{-7}$  M) gewählt. Die Grundstruktur des Versuchsablaufes glich dem Ablauf der Experimente „Hauptversuche zur CGRP-Wirkung“ (s.o.), wobei 10 Minuten nach Beginn der CGRP-Superfusion ein Slowing-Protokoll wiederholt und danach für 15 Minuten mit SIF gespült wurde. Daraufhin wurde ein weiteres Slowing-Protokoll durchgeführt. Die Reizfrequenz außerhalb des Slowing-Protokolls betrug 0,1 Hz.

Protokoll						
Referenz		CGRP		Kontrolle		
Slowing	Temperatur	$10^{-7}$ M	Slowing	Slowing	Mechan. Reiz	Capsaicin

**Tabelle 3:** Protokoll der Versuche mit einer CGRP Konzentration und einem unter CGRP Superfusion durchgeführtem Slowing-Protokoll. Die weiteren Schritte entsprechen den Erläuterungen zu Tabelle 1.

Die Zeit der Superfusion verlängerte sich durch das Slowing-Protokoll um 16 Minuten. Den Abschluss des Experiments bildeten der mechanische Test und die Superfusion mit Capsaicin.

**Slowing unter Superfusion mit CGRP<sub>8-37</sub>.** Bei diesen Experimenten wurde untersucht, ob die Wirkung von CGRP auf das Slowing durch den CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> gehemmt werden kann. Nach Charakterisierung der Fasern („Slowing“ und „Temperatur“) wurde CGRP<sub>8-37</sub> ( $10^{-6}$  M) eingewaschen und das Slowing-Protokoll mit nachfolgender Spülphase wie oben dargestellt durchgeführt. Dieser Ablauf wiederholte sich bei gleichzeitiger Superfusion von CGRP<sub>8-37</sub> und CGRP, CGRP als Einzelsubstanz und schließlich in der Kontrolle ohne CGRP. Abschließend wurden die restlichen Charakterisierungsschritte durchgeführt.

Protokoll						
Referenz		CGRP <sub>8-37</sub>			CGRP <sub>8-37</sub> + CGRP	
Slowing	Temperatur	10 <sup>-6</sup> M		Slowing	10 <sup>-6</sup> M + 10 <sup>-7</sup> M	
Fortsetzung						
CGRP <sub>8-37</sub> + CGRP	SIF	CGRP		Kontrolle		
Slowing-		10 <sup>-7</sup> M	Slowing-	Slowing	Mechan. Reiz	Capsaicin

**Tabelle 4:** Zusammenfassung des Protokolls der Versuche mit CGRP und dem Antagonisten CGRP<sub>8-37</sub>. Es wurde nach den Charakterisierungsschritten Slowing und Temperatur zuerst der Antagonist CGRP<sub>8-37</sub> superfundiert und ein weiteres Slowing-Protokoll durchgeführt. Nach einer Spülphase mit SIF wurden Agonist und Antagonist superfundiert und nach Slowing-Protokoll und SIF-Phase CGRP als Einzelsubstanz eingewaschen. Nach einem weiteren Slowing-Protokoll wurde die Kontroll-Slowingkurve unter SIF erstellt und abschließend der mechanische und der Capsaicin-Reiz appliziert.

**Slowing unter Superfusion mit Glibenclamid.** Glibenclamid, ein Sulfonylharnstoffderivat, blockiert ATP-sensitive Kaliumkanäle und an mesenterialen Afferenzen glatter Muskelzellen der Ratte den Effekt von CGRP (Dunn et al., 2003). In diesem Versuchsabschnitt wurde untersucht, ob die Wirkung von CGRP auf das Slowing über Glibenclamid-sensitive Kaliumkanäle vermittelt wird. Der Ablauf folgte dem gleichen Protokoll wie im vorhergehenden Abschnitt für CGRP<sub>8-37</sub> beschrieben.

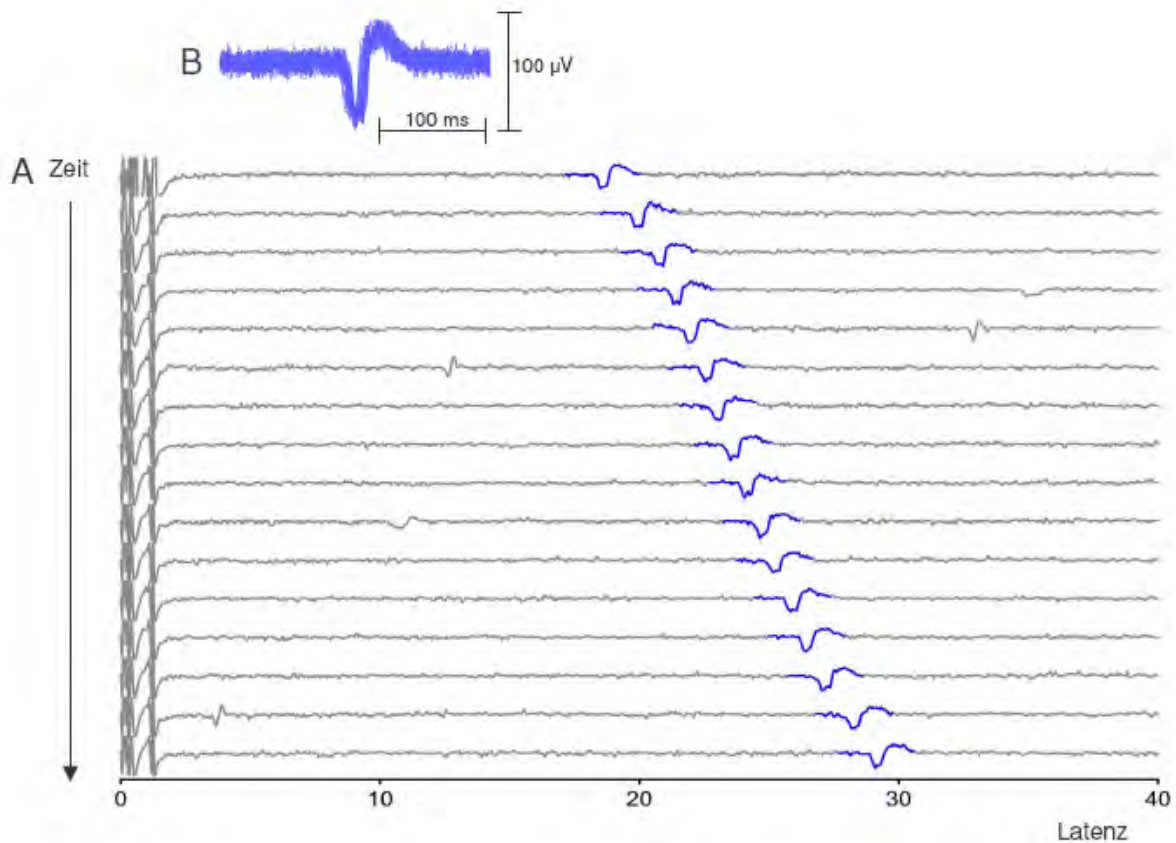
Protokoll						
Referenz		Glibenclamid		Glibenclamid + CGRP		
Slowing	Temperatur	10 <sup>-5</sup> M	Slowing	10 <sup>-5</sup> M + 10 <sup>-7</sup> M		
Fortsetzung						
Glibenclamid + CGRP	SIF	CGRP		Kontrolle		
Slowing		10 <sup>-7</sup> M	Slowing	Slowing	Mechan. Reiz	Capsaicin

**Tabelle 5:** Überblick über die Versuche mit dem Sulfonylharnstoffderivat Glibenclamid. Der Ablauf dieser Versuchsreihe entspricht dem Ablauf wie in Tabelle 4 erläutert. Einziger Unterschied besteht in der Verwendung von Glibenclamid anstelle des CGRP-Antagonisten.

### 3.6 Auswertung und Statistik

**Latenzen.** Die Leitungslatenzen der Axone wurden mit einem ursprünglich für die Mikroneurographie erstellten Programm ausgewertet. Im ersten Schritt wurden die Daten aus Spike exportiert. Es wurde ein Reizantwortfenster geöffnet, in dem Abschnitte von jeweils ca. 50 ms der Originalregistrierung untereinander angeordnet wurden. Sie zeigten den Reizartefakt und die Zeit nach dem elektrischen Reiz in zeitlicher Abfolge, so dass die Aktionspotentiale identischer Fasern zugeordnet werden konnten. Es dient zur Auswertung der Leitungslatenz im zeitlichen Verlauf.

Die Daten wurden dann in Excel oder Igor Pro zur weiteren Bearbeitung übertragen.



**Abbildung 8:** **A:** Beispiel für ein Reizantwortfenster, dargestellt mit dem Programm Drever. Es zeigt horizontal den Verlauf mit Reizartefakt (0 ms) und Reizantwort einer Faser. Vertikal angeordnet ist die zeitliche Abfolge der wiederholten Messungen, jeweils beginnend mit dem Reizartefakt und der folgenden 40 ms. Die Reizfrequenz wurde so gewählt, dass es zu einer Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing) kommt. Sie beginnt bei 19 ms und endet bei 29 ms. **B:** Die Aktionspotentiale wurden anhand ihrer Form und ihrer Latenzantwort der antwortenden Nervenfasern zugeordnet. Für diese Darstellung wurden 100 Aktionspotentiale übereinander gelegt.

**Aktivität.** Des Weiteren wurde das Programm Spike zur Auswertung der Aktivität einzelner Nervenfasern in den verschiedenen Versuchsabschnitten der Echtzeitaufzeichnungen verwendet. Ein Suchprogramm erkennt dabei die einzelnen Spikes einer definierten Faser nach verschiedenen Kriterien



wie Amplitude oder Dauer und ordnet sie zeitlich dem Versuchsablauf zu. Eine Faser wurde durch einen Reiz als aktiviert erkannt, wenn nach Reizapplikation bei vorher fehlender Spontanaktivität Aktionspotentiale auftraten (vor allem nach CGRP) oder eine zusätzliche Salve schnell aufeinanderfolgender Aktionspotentiale über eine kurze Zeitspanne hinweg (Burst) ausgelöst wurde (z.B. nach Capsaicin).

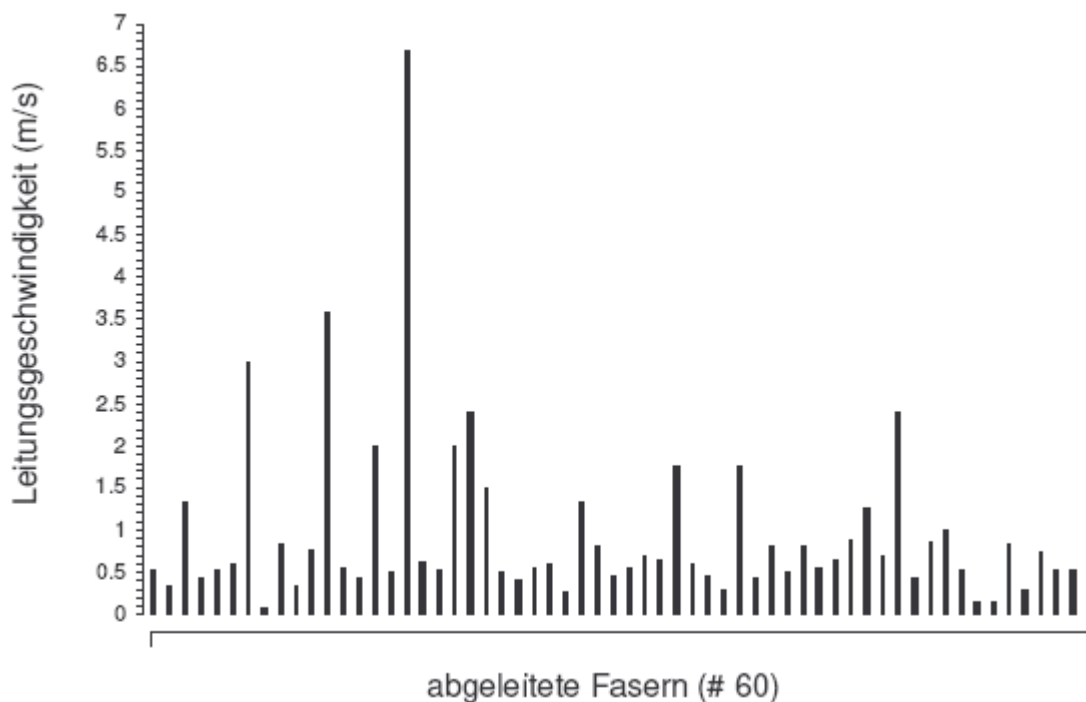
**Slowing.** Um die Änderungen der Leitungslatenzen während dem Slowing-Protokoll zu beurteilen, wurde von den Daten im Programm Igor Pro eine Trendlinie (Mittelwerte der einzelnen Punkte) ermittelt (Beispielkurve der Daten siehe Abbildung 5, Kapitel 1.6). Die Werte dieser Trendlinie (Anfangspunkt, Endpunkt) wurden in Excel übertragen und dort die Werte der Anfangslatenzen von den Endpunkten der Trendlinie abgezogen. Es wurden somit die relativen Änderungen in der jeweiligen Kurve verglichen.

**Statistik.** Nachfolgend wurden die Daten zur statistischen Auswertung mit dem Programm Statistika bearbeitet. Als statistisch signifikant wurden Änderungen der Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  festgelegt. Mit einer Varianzanalyse (Analysis of variances = Anova) mit Messwiederholungen und nachfolgendem Post-hoc Test (Tukey HSD Test oder LSD Test) wurden die Datenreihen auf ihre Signifikanz überprüft.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 **Eigenschaften primärer Afferenzen der Dura mater der Ratte**

Insgesamt wurden 60 Einzelafferenzen (Units) der Dura mater mit Leitungsgeschwindigkeiten zwischen 0,22 und 6,67 m/s abgeleitet. Sieben Units mit Leitungsgeschwindigkeiten von über 2 m/s wurden dabei der A<sub>δ</sub>-Faserklasse zugeordnet. Die übrigen 53 als C-Fasern klassifizierten Units hatten Leitungsgeschwindigkeiten von unter 1,75 m/s. Die durchschnittliche Leitungsgeschwindigkeit dieser Kategorie betrug 0,65 m/s. Fasern mit deutlicher Spontanaktivität wurden aus dem Datensatz ausgeschlossen.



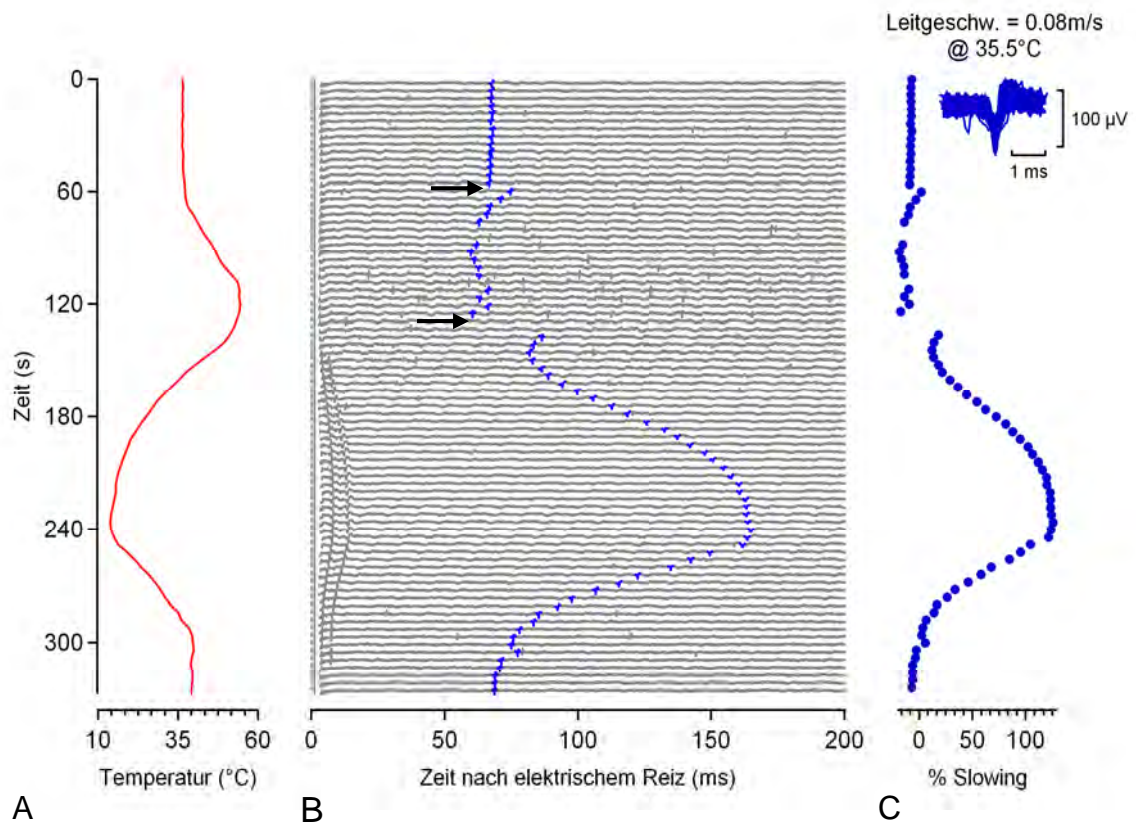
**Abbildung 9:** Balkendiagramm der Leitungsgeschwindigkeiten der in die Datenmenge aufgenommenen Fasern. Der überwiegende Anteil der abgeleiteten Fasern liegt im Bereich der C-Fasern (53 Fasern). Die restlichen 7 Fasern liegen im Leitungsgeschwindigkeitsbereich von A-Fasern.

**Temperaturempfindlichkeit.** Erhöhung der Badtemperatur führt zu einem Anstieg der Leitungsgeschwindigkeit. Damit wird die Latenz nach elektrischer Stimulation kürzer und es kommt zu einer Linksverschiebung der Aktionspotentiale. Wird eine wärmesensitive Faser durch das Überschreiten ihrer Schwellentemperatur aktiviert, verlangsamt sich die Leitungsgeschwindigkeit sprunghaft und die Latenz verschiebt sich im Zeitdiagramm deutlich nach rechts. Bei anhaltender Reiztemperatur nähert sich die Latenz langsam wieder dem Wert an, der vor der Aktivierung bestand (Adaptation). Wird die Faser erneut durch einen Hitzereiz aktiviert, verläuft die Latenz wiederum mit einem Sprung nach rechts.

Beim Abkühlen der Badtemperatur wird die Leitungsgeschwindigkeit geringer (Rechtsverschiebung der Aktionspotentiale). Aktivierung kältesensitiver Afferenzen in dieser Situation wird ebenfalls durch eine sprunghafte Latenzverlängerung (Rechtsverschiebung) sichtbar. Das Temperaturprotokoll bestand in der Regel aus Erwärmung der Superfusionslösung mit nachfolgender Abkühlung und schließlich Wiedererwärmung bis auf Ausgangstemperatur.

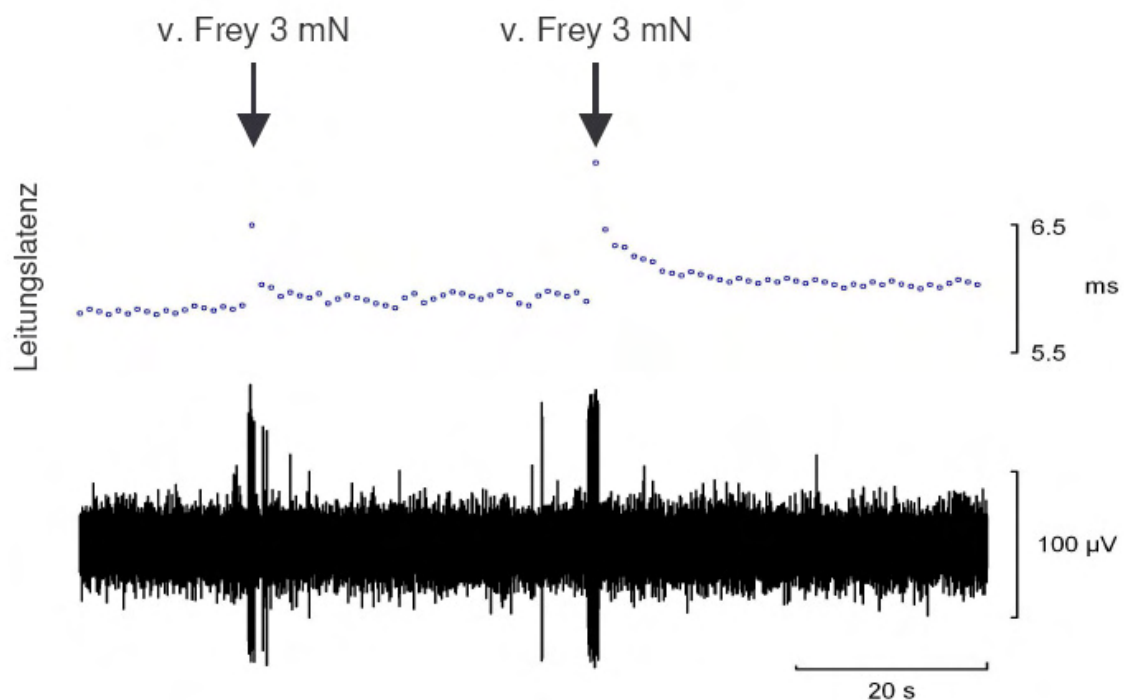
Die Wärme- bzw. Hitzesensibilität wurde bei 46 Units geprüft. Bei 22 Fasern (20/40 C-Fasern und 2/6 A<sub>δ</sub>-Fasern) ließ sich während der Temperaturerhöhung durch die sprunghafte Rechtsverschiebung der Latenz eine Aktivierung feststellen. Die Schwelle für die Aktivierung lag zwischen 35°C und 50°C, der durchschnittliche Wert betrug 41,3°C +/- 3,7°C. Eine Faser wurde erst bei einer Temperatur von 50°C aktiviert, alle anderen Schwellen lagen zwischen 35°C und 45,5°C.

Die Kältesensibilität wurde bei 35 Fasern durch Abkühlung auf durchschnittlich 15,1°C +/- 2,6°C untersucht. Keine dieser Fasern wurde durch das Kälteprotokoll aktiviert.



**Abbildung 10:** Antwort einer C-Faser auf Veränderungen der Umgebungstemperatur. Vertikal befindet sich die Zeitachse. A: Verlauf der Badtemperatur. B: Darstellung der Aktionspotentiale im Reizantwortfenster. C: Prozentuale Darstellung der Latenz, normiert auf die Anfangslatenz der Faser. Bei Erwärmung der Badtemperatur kommt es zu einer Linksverschiebung des Aktionspotentials (Verkürzung der LG). Mit Überschreitung des Schwellenwertes wird die Nervenfasern aktiviert und die Leitungsgeschwindigkeit verlangsamt sich sprunghaft. Die Latenz verschiebt sich nach rechts (Pfeile). Während der Abkühlung der Badtemperatur folgt das AP der Temperatur und die Latenz verschiebt sich nach rechts (LG wird langsamer). Es kommt zu keiner Aktivierung der Faser.

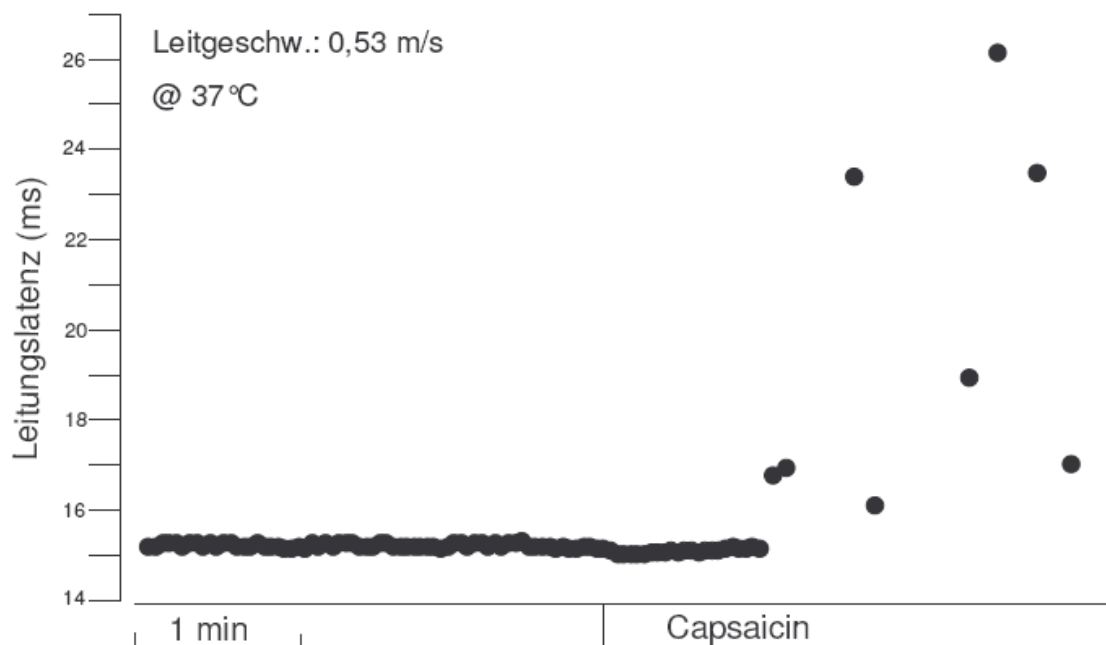
**Mechanosensibilität.** Bei der Prüfung auf Mechanosensibilität (leichte Druckreize mit von-Frey-Filamenten) antworten mechanosensible Units beim Überschreiten der von-Frey-Schwelle in der Regel mit einem Aktionspotential-Burst auf den Reiz und die Latenz zeigt einen Sprung nach rechts.



**Abbildung 11:** Darstellung einer mechanosensiblen Faser und deren Aktivierung durch ein von-Frey-Filament mit der Stärke 3 mN (Zeitachse horizontal). Diese Aktivierung war reproduzierbar (Pfeile) und die Latenz stieg, wie im oberen Teil der Abbildung zu sehen, bei Stimulation mit dem von-Frey-Filament sprunghaft an.

Bei 31 Fasern ließen die Versuchsverhältnisse eine mechanische Reizung mit von-Frey-Filamenten zu. Von diesen reagierten 28, also ca. 90% (25/27 C-Fasern und 3/4 A<sub>δ</sub>-Fasern) mit einem charakteristischen Burst, der mit entsprechender Rechtsverschiebung der Leitungslatenz einherging.

**Capsaicinsensibilität.** Wird Capsaicin ( $1\ \mu\text{M}$ ) dem Gewebebad zugeführt, reagieren die Capsaicin-sensiblen Fasern nach fünf bis 15 Sekunden mit einer deutlichen Aktivierung (Salven von Aktionspotentialen) und die Latenz zeigt eine deutliche Rechtsverschiebung. Dieser Erregung folgt häufig eine Phase der Unerregbarkeit für chemische oder mechanische Reize, auch lässt sich durch elektrische Pulse der gleichen Reizstärke im rezeptiven Feld kein Aktionspotential mehr auslösen (Desensibilisierung).



**Abbildung 12:** Aktivierung einer Faser mit einer LG von 0,53 m/s durch Capsaicin. 1 Minute nach Einwaschung der Substanz wird die Faser aktiviert und es folgt eine Phase der Desensibilisierung. Die Faser lässt sich nicht mehr mit jedem elektrischen Reizimpuls aktivieren und die Leitungslatenz ist erhöht.

Von 26 Fasern, die am Ende des Experiments noch zuverlässig mit den elektrischen Impulsen erregbar waren, wurden 20 durch Capsaicin aktiviert. Davon waren 18/22 C-Fasern und 2/4  $A_{\delta}$ -Fasern.

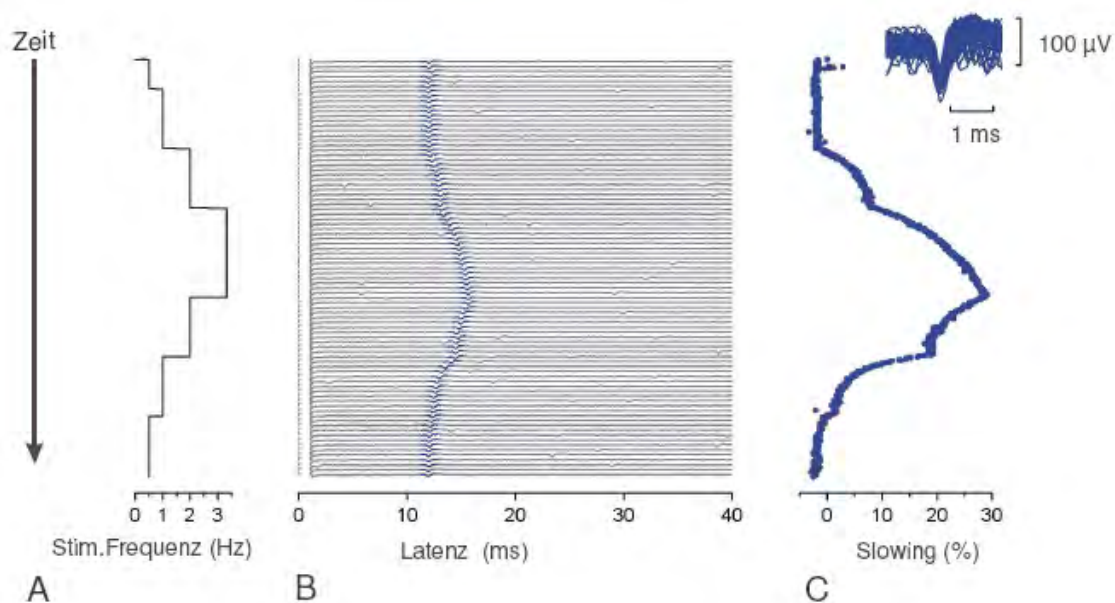
**Aktivierung durch verschiedene Reize.** Bei 12 Fasern wurden mechanische, thermische (Hitze) und chemische Reize (Capsaicin) getestet. Von diesen wurden sechs Units (50%) von allen drei Reizen aktiviert, drei (25%) wurden durch zwei der drei Reize aktiviert und drei Fasern (25%) reagierten nur auf die mechanische Reizung.

Bei 21 Fasern konnten zwei der drei Reize (thermisch/mechanisch, thermisch/chemisch oder mechanisch/chemisch) appliziert werden. 11 (52,4%) dieser Fasern wurden von beiden Reizen aktiviert, sechs (55%) von der Kombination thermisch/mechanisch und zwei (18%) von der Kombination thermisch/chemisch. Drei (27%) Fasern reagierten auf die mechanische und chemische Testung. Die übrigen 47,6% wurden von je einem Reiz aktiviert.

**Zusammenfassung.** Die Daten zeigen, dass 90% der 31 mechanisch getesteten Fasern durch den mechanischen Reiz aktivierbar waren. Von den mit den Temperaturprotokollen (Hitze und Kälte) getesteten 46 Units reagierten 47,8% auf den Wärme- bzw. Hitzereiz, 0% von 35 auf den Kältereiz. Von 26 mit Capsaicin getesteten Fasern wurden 77% aktiviert.

**Wirkung der erhöhten Reizfrequenz auf die Latenz (Slowing).** Bei einer elektrischen Reizfrequenz von 2 Hz zeigten alle Units die typische aktivitätsabhängige Erhöhung der Leitungslatenz (Slowing). Dabei nimmt bei Beginn der elektrischen Stimulation die Latenz rasch zu, diese Zunahme flacht aber mit der Zeit immer mehr ab und erreicht je nach Faser nach etwa 2 bis 2,5 Minuten ein Plateau (Form einer e-Funktion). Bei Reduktion der Reizfrequenz auf 0,5 Hz (Erholungsphase) kehrt die Latenz mit etwa derselben Zeitkonstante zu einem niedrigeren, für diese Reizfrequenz charakteristischen, Wert zurück.

Jede Faser reagierte mit verschieden starker Veränderung der Leitungslatenz. Es entstand dadurch für jede Faser eine individuelle und charakteristische Kurve im zeitlichen Verlauf der Latenzveränderung.



**Abbildung 13:** Darstellung mit Reizfrequenz (A), Reizantwortfenster und prozentualer Änderung der Latenz zur Anfangslatenz (C). Es wurden verschiedene Stimulationsfrequenzen gewählt um aufzuzeigen, dass sich die Latenz der Nervenfasern je nach Änderung der Stimulationsfrequenz verändert.

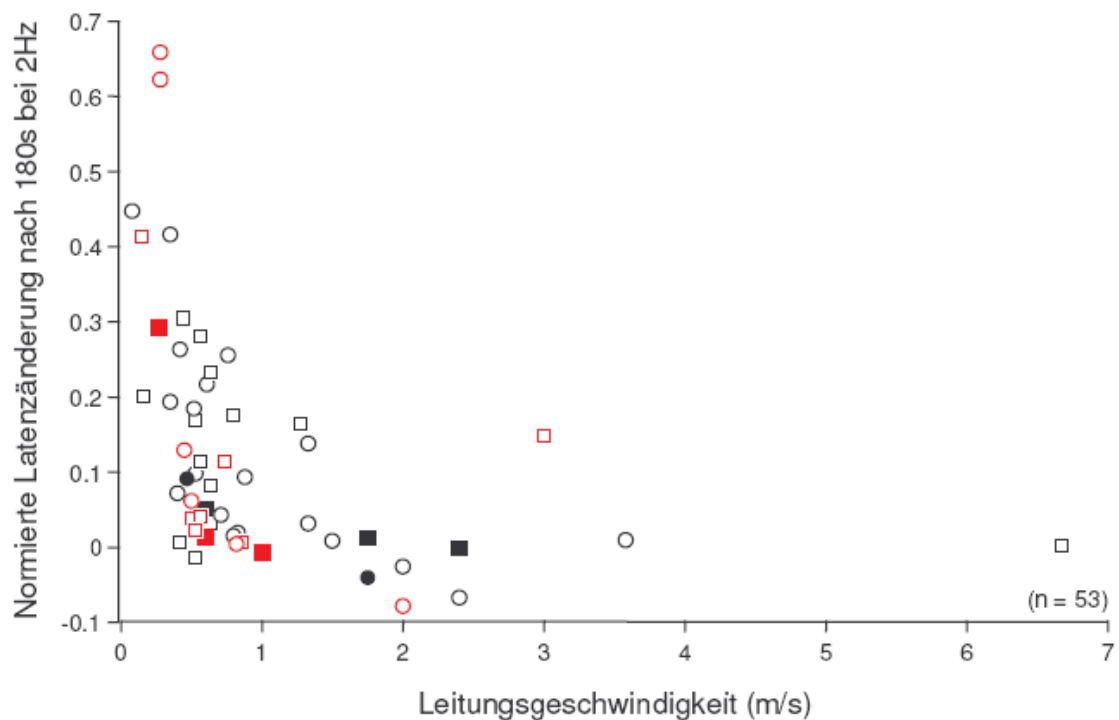


## Ergebnisse

LG m/s	Slowing bei 2Hz %	LG m/s	Slowing bei 2Hz %	LG m/s	Slowing bei 2Hz %
0.53	-1.330275229	0.76	25.53453947	2.4	-0.144032922
0.35	41.57729748	3.58	0.952380952	1.5	0.823045267
1.33	13.81355932	0.56	11.42936707	0.5	3.814262023
0.42	0.721784777	0.45	12.89521229	0.4	7.177627495
0.53	9.774193548	2	-7.845117845	0.57	4.090909091
0.6	5.130208333	0.5	6.157480315	0.6	1.368849427
3	14.81481481	6.67	0.216216216	0.27	29.26851852
0.08	44.70855413	0.63	3.293293293	1.33	3.140916808
0.83	1.909090909	0.53	16.8990228	0.8	1.5
0.35	19.33445245	2	-2.582582583	0.47	3.814852492
0.57	0.680272109	0.5	N.N.	1	-0.741350906
0.71	4.266347687	0.8	17.52008032	0.53	2.259887006
0.64	8.249772106	0.57	28.11824081	0.16	20.07013201
1.75	-4.050632911	0.64	23.26057299	0.15	41.36915716
0.61	21.67420814	0.88	9.315589354	0.82	0.420673077
0.47	9.126213592	1.27	16.38418079	0.28	65.86181278
0.28	62.20198675	0.7	33.64811133	0.74	11.30705394
1.75	1.2	2.4	-6.719367589	0.52	11.18538324
0.42	26.28956624	0.44	30.49698795	0.52	18.44267397
0.8	NN.	0.86	0.657276995	0.22	44.50602232
LG m/s	Slowing bei 2Hz %	LG m/s	Slowing bei 2Hz %	LG m/s	Slowing bei 2Hz %

**Tabelle Nr. 7:** Überblick über die abgeleiteten Nervenfasern mit Leitungsgeschwindigkeit und prozentualer Änderung der Leitungslatenz (Slowing) bei einer Reizfrequenz von 2 Hertz für 180 Sekunden. (N.N. = Daten waren nicht auswertbar in Bezug auf das Slowing).

Als Maß für das Slowing individueller Units wurde die prozentuale Änderung der Leitungslatenz während Stimulation mit 2 Hz anhand der zehn letzten Werte vor dem Umschalten der Reizfrequenz auf 0,5 Hz bestimmt.



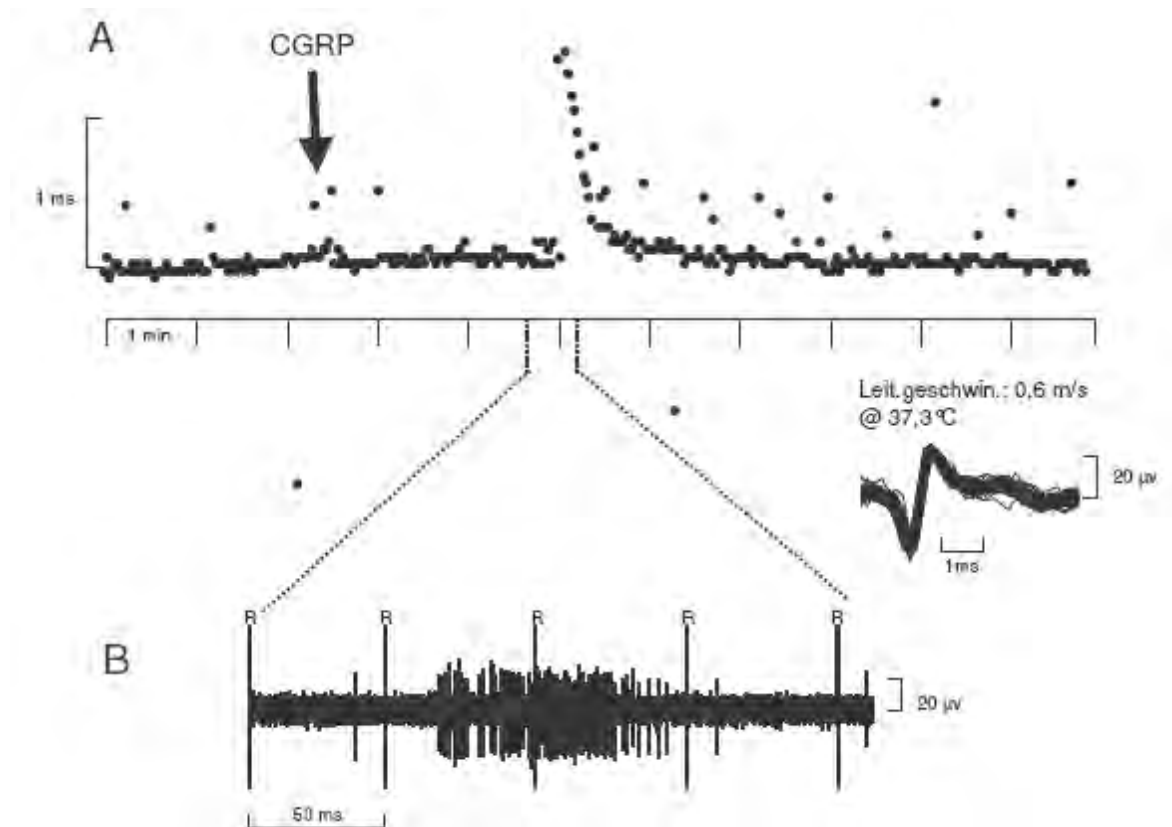
**Abbildung 14:** Diagramm mit Darstellung der normierten Latenzänderung nach 180s bei 2Hz (vertikal) zur Leitungsgeschwindigkeit der Fasern (horizontal) und die Eigenschaften der Fasern in Bezug auf ihre Aktivierung durch CGRP, Hitze und mechanische Reize. Es ist keine lineare Korrelation der Eigenschaften erkennbar, abgesehen von einer negativen Korrelation zwischen Leitungsgeschwindigkeit und dem Maximalwert des Slowings.

- ■ ■ ausgefüllte Felder stehen für eine Aktivierung durch CGRP
- ■ viereckige Form steht für Mechanosensibilität der Faser
- □ ■ rote Farbe steht für Hitzesensibilität der Faser

#### 4.2 Wirkung von CGRP auf primäre Afferenzen der Dura mater

Es wurde untersucht, inwieweit die Leitungsgeschwindigkeit der abgeleiteten Fasern durch CGRP beeinflusst wurde. Ebenso wurden sprunghafte Latenzveränderungen ausgewertet. Außerdem wurde über das Spike-Erkennungsprogramm die Aktivität beurteilt.

Zunächst wurden sieben Experimente mit steigenden Konzentrationen von CGRP durchgeführt (s. 3.5.1 Durchführung Vorversuche). Bei einer Faser zeigte sich, wie in Abbildung 15 A zu sehen, 2,5 Minuten nach Beginn der Superfusion mit  $10^{-7}$  M CGRP eine sprunghafte Zunahme der Leitungslatenz um 13% (Latenzsprung von 9,75 ms auf 11,05 ms). Ebenso zeigte die Faser in der Spikeanalyse eine Aktivierung mit zusätzlichen Aktionspotentialen, dies wird in Teil B der Abbildung dargestellt.

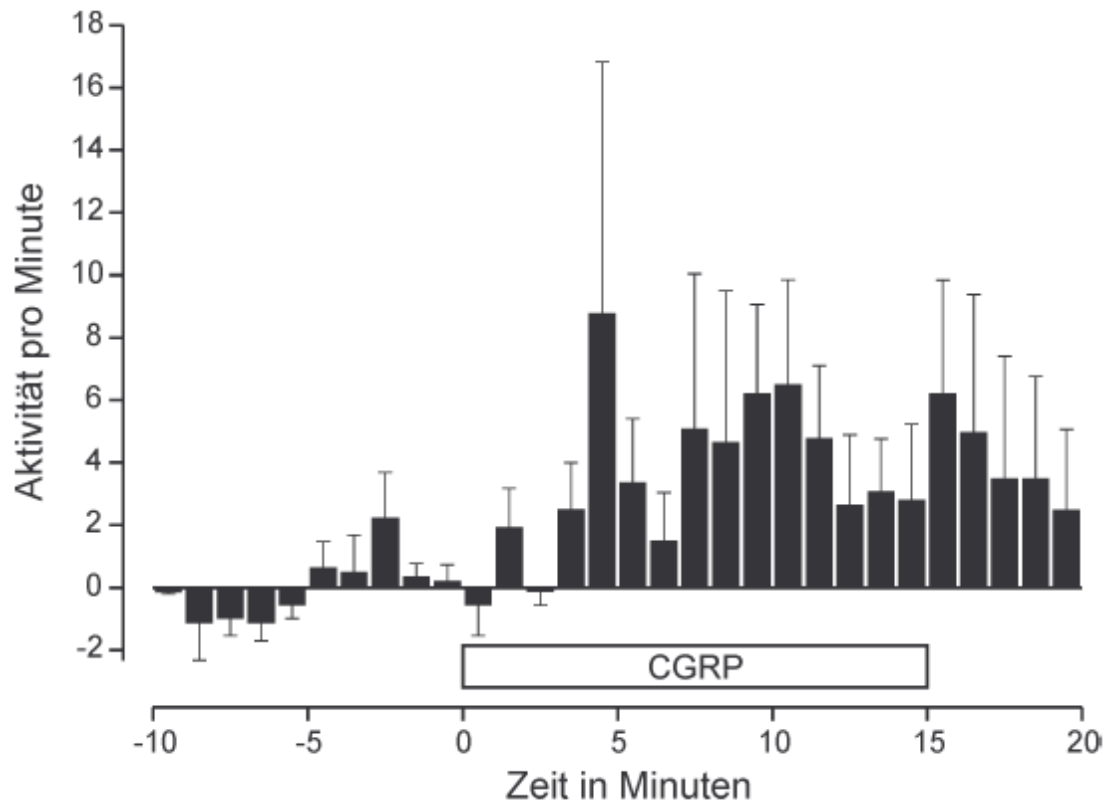


**Abbildung 15:** Wirkung von CGRP ( $10^{-7}$  M) auf die Leitungsgeschwindigkeit einer C-Faser. In A ist die Änderung der Latenz im horizontalen Verlauf dargestellt. Es handelt sich hierbei um ein Zeitfenster des in B dargestellten Zeitverlaufs. Diese dort deutlich sichtbaren Aktionspotentiale, die unabhängig von den elektrischen Reizimpulsen (R) auftreten, führen zu einem sprunghaften Anstieg der Leitungslatenz.

In Teil A der Hauptversuche (s. 3.5.1 Hauptversuche) mit sechs Experimenten führte die Superfusion von CGRP in der Konzentration  $10^{-8}$  M zu keinen Veränderungen der Aktivität und/oder der Latenz bei den untersuchten Fasern über eine Zeitspanne von durchschnittlich 14 Minuten. In fünf weiteren Experimenten (Teil B der Hauptversuche) mit Superfusion von CGRP ( $10^{-7}$  M) kam es entsprechend der Spikeanalyse bei drei Units zu einer Aktivierung nach Beginn der Superfusion (Unit Nr. 21: nach 9 min, Unit Nr. 26: nach 8 min und Unit Nr. 27: nach 3 min).

In der Experimentreihe, in welcher die Wirkung von CGRP und/oder CGRP<sub>8-37</sub> oder Glibenclamid auf das Slowing untersucht wurde, wurde ebenfalls eine eventuelle Aktivierung ausgewertet. In diesen Versuchen kam es laut Spikeanalyse bei vier Fasern zu den charakteristischen Veränderungen während der Superfusion mit CGRP in der Konzentration  $10^{-7}$  M. Diese Aktivierung erfolgte bei Unit Nr. 28 zweimalig nach sieben Minuten und in der Stimulationspause vor dem Slowing-Protokoll, bei Unit Nr. 36 nach 14 Minuten. Unit Nr. 38 wurde nach sieben Minuten aktiviert und Unit Nr. 51 nach sechzehn Minuten (ebenfalls in der Stimulationspause vor dem Slowing-Protokoll).

**Zusammenfassung.** Während der Superfusion mit CGRP ( $10^{-7}$  M) kam es bei acht von 53 abgeleiteten Fasern zu einer Aktivierung, die mit Hilfe der Spike-Analyse festgestellt wurde (Kriterium für Aktivierung, siehe 3.6 Aktivität). Dies führte jedoch nur im Fall der ersten Unit auch zu einer Latenzänderung, die mit dem Marking-Verfahren festgestellt werden konnte.

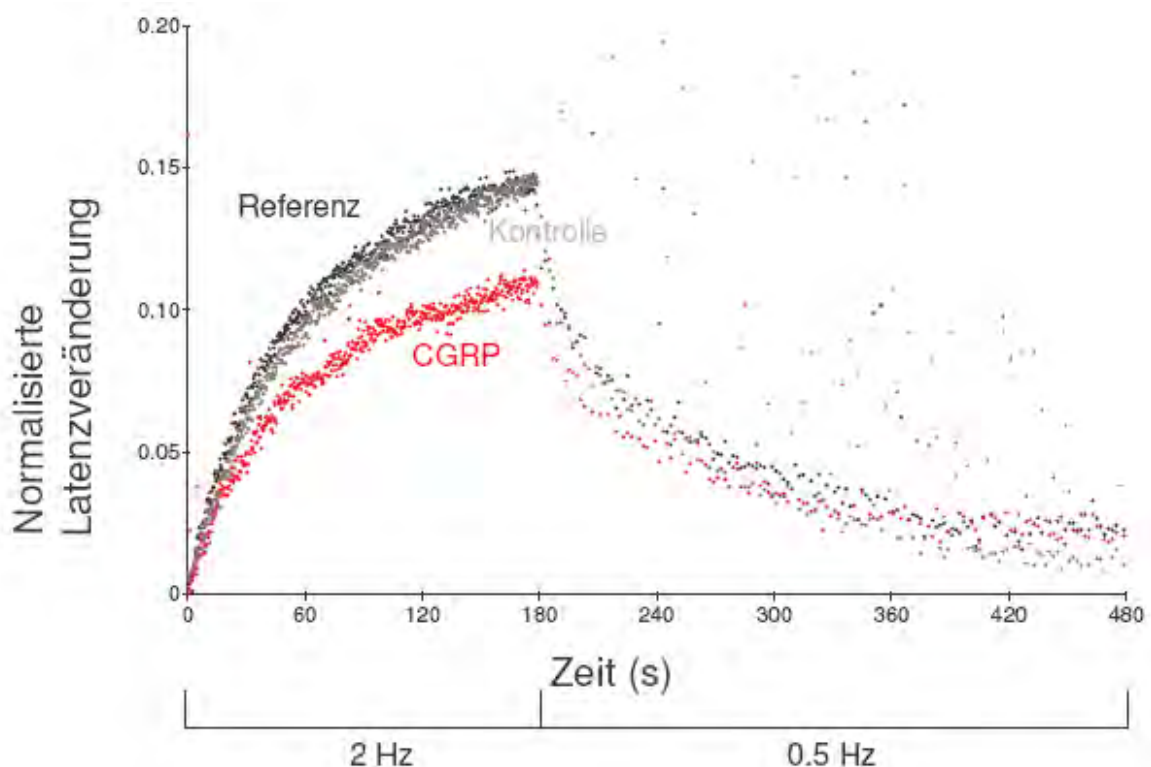


**Abbildung 16:** Änderung der Aktivität pro Minute unter CGRP Superfusion. Die Säulen beinhalten die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Aktivität pro Minute von sieben Fasern, bei denen mit der Spike-Analyse eine Aktivierung während der CGRP Superfusion festgestellt werden konnte. Die durch den Reizimpuls ausgelösten Aktionspotentiale wurden von der Gesamtaktivität subtrahiert. Die sichtbare Tendenz ist statistisch durch die geringe Anzahl der Versuche nicht eindeutig zu sichern.

### 4.3 Einfluss von CGRP, CGRP<sub>8-37</sub> und Glibenclamid auf die aktivitätsinduzierte Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing)

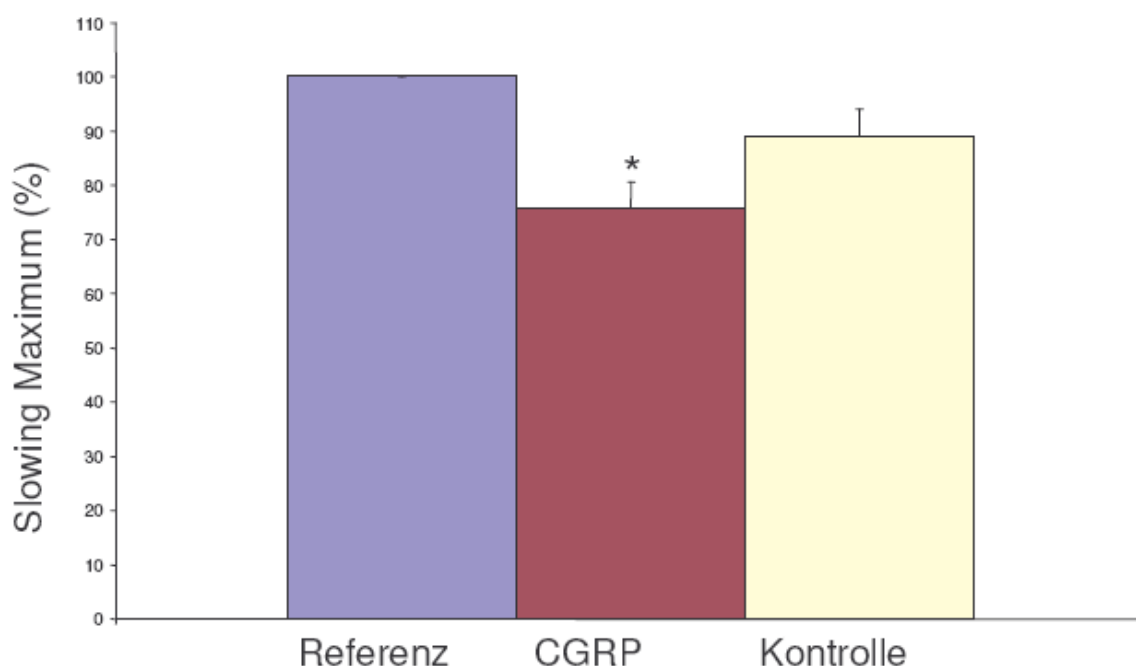
#### 4.3.1 Wirkung von CGRP auf den Verlauf der Slowingkurve

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob CGRP eine Wirkung auf den Latenzverlauf während des Slowing-Protokolls (Slowingkurve) hat. Als Referenzkurve wurde die Charakterisierungskurve (s. 3.4.4.) herangezogen. Die Superfusion mit CGRP ( $10^{-7}$  M) führte in allen Experimenten ( $n = 12$ ) im Vergleich zur Kontrolle zu einer verminderten Latenzerhöhung (abgeflachte Slowingkurve). Die Kontrollkurve nach Auswaschen des CGRP wich nur wenig von der anfänglichen Referenzkurve ab.



**Abbildung 17:** Vergleichende Darstellung der Latenzkurven während der Stimulation mit 2 Hertz vor (Referenz), während (CGRP) und nach (Kontrolle) der Superfusion mit CGRP. Es zeigt sich deutlich das geringere Slowing unter dem Einfluss von CGRP. Der Effekt ist auswaschbar, die Kontrolle liegt wieder im Bereich der Referenzkurve.

Für die statistische Berechnung wurde der maximale Wert der Trendlinie der Latenzänderung (s. 3.6 Slowing) am Ende der Slowing-Kurve (2 Hz Stimulation für 180 s) vergleichend ausgewertet. Die Latenzänderung nach CGRP war signifikant verschieden von dem entsprechenden Wert der Referenzkurve (ANOVA mit Tukey HSD Test,  $n = 12$ ,  $df = 22,000$ ,  $p \leq 0,05$ ).

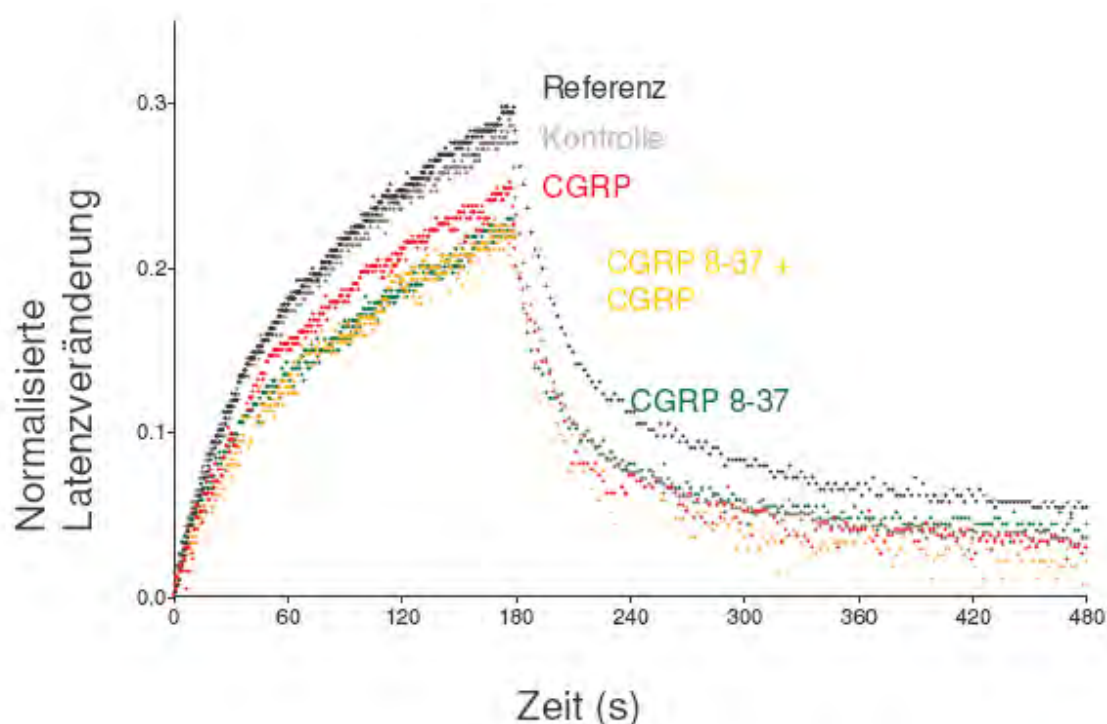


**Abbildung 18:** Effekt von CGRP auf das Slowing ( $n = 12$ ). Die Balken stellen die maximale Änderung der Latenz  $\pm$  SEM zum Ende der Reizperiode mit 2 Hertz dar. Die Werte sind in Prozent zum Referenzbalken dargestellt. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Latenzwerte zwischen Referenz und CGRP (ANOVA mit Tukey HSD Test,  $df = 22,000$ ,  $p \leq 0,05$ ).

#### 4.3.2 Wirkung von CGRP<sub>8-37</sub> und CGRP

In diesen Versuchen ( $n = 11$ ) wurde untersucht, ob der Effekt des CGRP auf die Slowingkurve durch die gleichzeitige Superfusion des Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> blockiert werden kann, d.h. ob die

CGRP-Wirkung über CGRP-Rezeptoren vermittelt wird. Beim Beispiel von Abbildung 19 wurde zunächst CGRP<sub>8-37</sub> ( $10^{-6}$  M) alleine superfundiert (n = 10). Es bewirkte eine Abflachung der Slowingkurve ähnlich wie CGRP. Wurde CGRP ( $10^{-7}$  M) zusammen mit dem Antagonisten ( $10^{-6}$  M; n = 10) oder CGRP als Einzelsubstanz (n = 8) verabreicht, kam es zu einer ähnlichen Absenkung der Latenzänderung. In der Kontrolle nach Auswaschen der Substanzen war der Effekt wieder weitgehend aufgehoben.

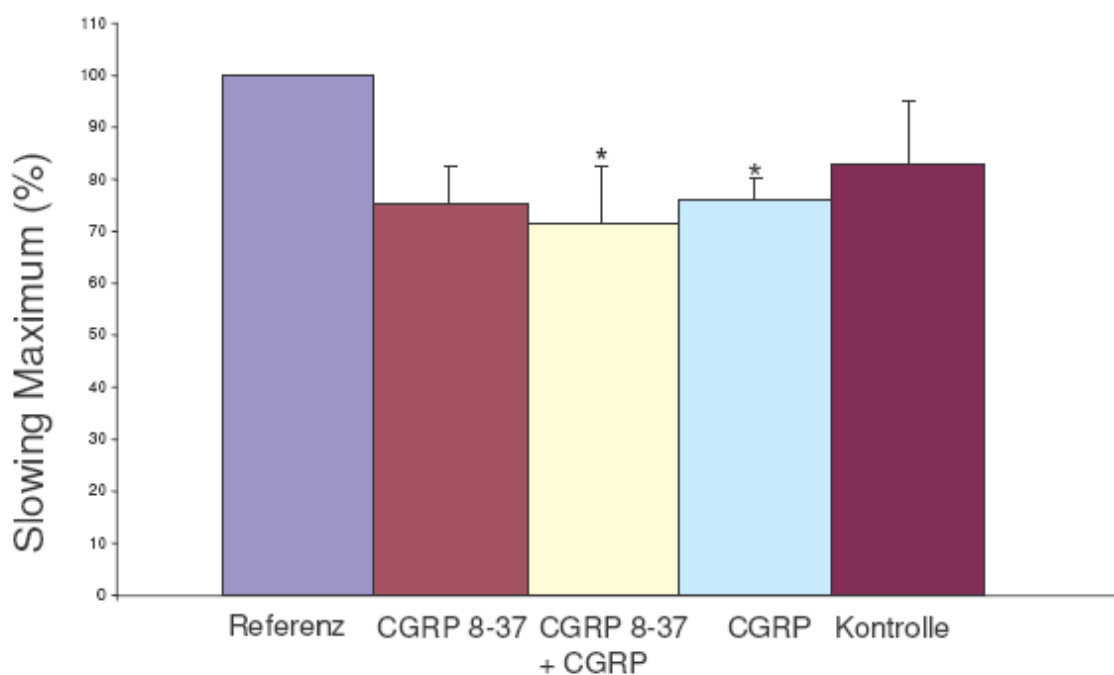


**Abbildung 19:** Vergleichende Darstellung der Slowingkurven mit Referenzkurve unter CGRP, CGRP<sub>8-37</sub> + CGRP, CGRP<sub>8-37</sub> und Kontrolllösung (SIF). Auch unter CGRP<sub>8-37</sub> und CGRP<sub>8-37</sub> + CGRP kommt es zu dem Phänomen der Slowingänderung. Die Kontrollkurve liegt im Bereich der Referenzkurve.

Bei Betrachtung aller Experimente dieser Art war statistisch signifikant (ANOVA mit LSD Test, n = 11, df = 20,000,  $p \leq 0,05$ ) der Unterschied zwischen der Referenzkurve und der Slowingkurve von CGRP/CGRP<sub>8-37</sub>



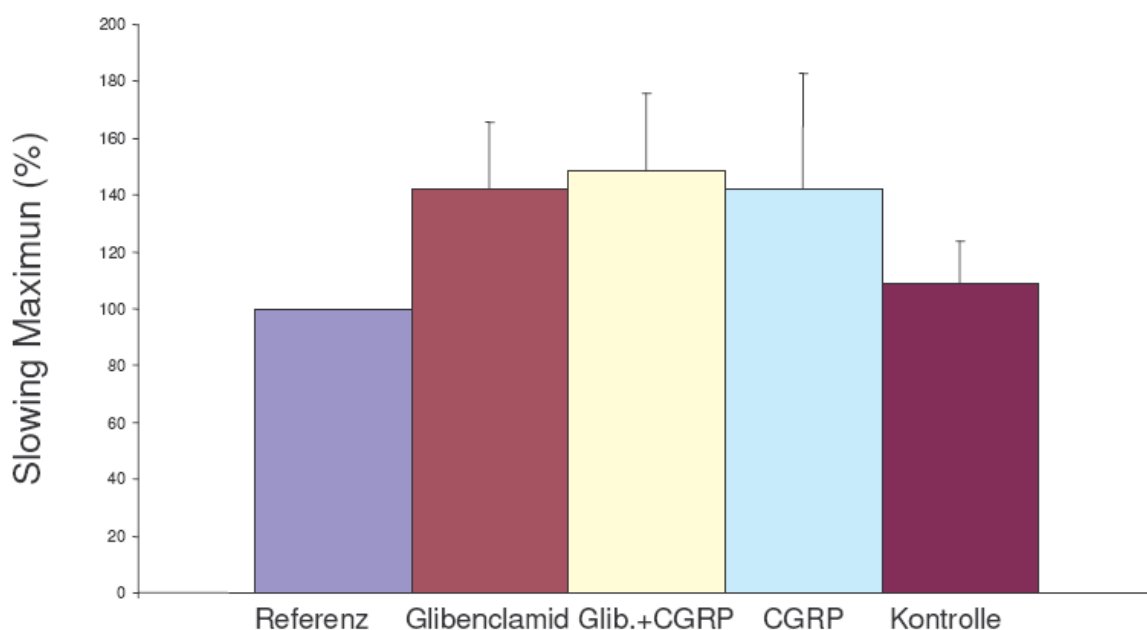
(n = 11) bzw. der Referenzkurve und der CGRP-Slowingkurve (n = 8). Nicht statistisch signifikant war jedoch der Unterschied zwischen der Referenzkurve und der CGRP<sub>8-37</sub>-Slowingkurve (n=11). Das heißt, der CGRP-Rezeptorantagonist konnte den Effekt von CGRP nicht verhindern, aber CGRP<sub>8-37</sub> hatte selbst keinen signifikanten Effekt auf das Slowing, auch wenn eine Tendenz in dieser Richtung besteht, da in mehreren Einzelmessungen, wie in Abbildung 19 dargestellt, die Kurve deutlich von der Referenzkurve abwich.



**Abbildung 20:** Effekt von CGRP und CGRP<sub>8-37</sub> auf das Slowing: Referenz (n = 11), CGRP<sub>8-37</sub> (n = 11), CGRP<sub>8-37</sub> + CGRP (n = 10), CGRP (n = 8) und Kontrolle (n = 11). Die Balken stellen die maximale Änderung der Latenz ± SEM zum Ende der Reizperiode mit 2 Hertz dar. Darstellung in Prozent zum Referenzbalken. Eine signifikante Änderung zeigt sich vom Referenzwert zu dem Wert unter CGRP/CGRP<sub>8-37</sub> Superfusion und zum CGRP Wert (ANOVA mit LSD Test, df = 20,000, p ≤ 0,05). Nicht signifikant ist die Änderung von Referenz zur Superfusion mit CGRP<sub>8-37</sub>.

#### 4.3.3 Einfluss von Glibenclamid auf die CGRP-Wirkung

Bei diesen Experimenten wurde untersucht, ob die Wirkung von CGRP auf das Slowing über Glibenclamid-sensitive Kaliumkanäle vermittelt wird. Glibenclamid ( $10^{-5}$  M;  $n = 5$ ) alleine und in Kombination mit CGRP ( $10^{-7}$  M;  $n = 6$ ) zeigte in der Tendenz eine Verstärkung der Latenzänderung im Slowing Protokoll (Versteilerung der Slowingkurve), ohne dass ein signifikanter Effekt zu ermitteln war. Im Anschluss war bei der Superfusion von CGRP als Einzelsubstanz ( $n = 6$ ) die Latenzänderung ebenfalls verstärkt. In der Kontrolle ( $n = 5$ ) war die Tendenz nahezu aufgehoben. Es wurden sechs Fasern mit Glibenclamid untersucht.



**Abbildung 21:** Zusammenfassung der Experimente mit Glibenclamid und CGRP (Referenz, Glibenclamid, Glibenclamid + CGRP, CGRP und Kontrolle,  $n = 6$ ). Die Balken stellen die maximale Änderung der Latenz  $\pm$  SEM zum Ende der Reizperiode mit 2 Hertz dar. Darstellung in Prozent zum Referenzbalken. Die maximalen Endpunkte zeigen eine Tendenz in der Verstärkung der Latenzänderung, dies wird jedoch nicht statistisch signifikant. Diese Tendenz wird in der Kontrolle wieder aufgehoben.

## 5 **Diskussion**

Migräne ist ein neurologisches Krankheitsbild und gehört zu den primären Kopfschmerzen, die weltweit einen großen Anteil der Bevölkerung betrifft (Arulmani et al., 2004). Migräneanfälle führen bei vielen Betroffenen zu einer Beeinträchtigung der Lebensqualität und des allgemeinen Wohlbefindens. Die sozioökonomischen Auswirkungen werden von der Öffentlichkeit oftmals unterschätzt (Ruiz, I et al., 2003). Allein in Europa kommt es jeden Tag zu bis zu 600.000 migränebedingten Arbeitsausfällen (Edvinsson, 2004).

Nach der Klassifikation der internationalen Kopfschmerzgesellschaft (IHS) ist Migräne eine episodisch auftretende Erkrankung, die zwischen vier und 72 Stunden anhält, meist unilateral, pulsierend und mit mittlerer bis starker Schmerzintensität auftritt. Oft leiden die Patienten an Übelkeit, Erbrechen, Lärm- und Lichtempfindlichkeit und sie sind bestimmten Gerüchen gegenüber empfindlich. Die Anfälle können vorausgehend mit einer Aura, reversiblen neurologischen Störungen wie visuellen oder somatosensorischen Symptomen gekoppelt sein (Olesen and Steiner, 2004).

Nozizeptive Vorgänge in der Peripherie des Nervensystems tragen zur Entstehung von Migräneschmerz bei, auch wenn zentrale Ursachen für dessen Entstehung vermutet werden. In diesem Zusammenhang wird der funktionellen Einheit des Trigeminovaskulären Systems mit seinen Mediatoren wie CGRP eine wichtige Rolle zugesprochen. CGRP wird bei Erregung der nozizeptiven Afferenzen freigesetzt und führt zu einer Vasodilatation der umliegenden Gefäße (Messlinger et al., 1995). Es sind jedoch noch weitere Wirkungen wahrscheinlich, da CGRP-Rezeptoren peripher nicht nur in der glatten arteriellen Gefäßmuskulatur vorkommen, sondern auch von marklosen Neuronen des Spinalganglions exprimiert werden (Segond et al., 2002). Bei Stimulation der Dura mater mit CGRP

kommt es zu einer erhöhten Histaminausschüttung aus degranulierenden Mastzellen (Schwenger et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Hauptfragen untersucht: Zum einen, ob meningeale Afferenzen der Ratte polymodale Eigenschaften besitzen und zum anderen, welche Einflüsse das Neuropeptid CGRP auf das Erregungsverhalten dieser Afferenzen hat.

Ein Großteil der abgeleiteten Axone konnte durch mindestens einen Reiz - mechanisch, thermisch oder chemisch – aktiviert werden, woraus geschlossen wurde, dass es sich um afferente Nervenfasern handelt. Die meisten dieser Afferenzen können als polymodal klassifiziert werden, da sie durch mehr als einen Reiz aktiviert werden konnten (siehe Kap. 5.2).

Die Superfusion mit dem Peptid CGRP führte bei acht von 53 Fasern zu einer schwachen, aber deutlichen Erregung (Zunahme der Aktionspotentiale). Da diese Erregung verzögert und nach unterschiedlicher Latenz auftrat, ist ein direkter erregender Effekt durch CGRP unwahrscheinlich. Des Weiteren führte CGRP zu einer verminderten aktivitätsbedingten Änderung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing). Zusammengenommen könnten diese Ergebnisse auf eine Sensibilisierung der meningealen Nozizeptoren durch CGRP hindeuten. Die Schwelle für unbemerkte Reize im Hintergrund, z.B. Temperaturschwankungen, Histamin und andere Substanzen, könnte erniedrigt worden sein, wodurch die Fasern durch diese Reize im Verlauf des elektrischen Stimulationsprotokolls für kurze Zeit erregt wurden und zusätzliche Entladungen zeigten.

### **5.1 In-vitro Dura-Nervenpräparat**

In der vorliegenden Arbeit wurde das in-vitro Modell als Grundlage der Experimente ausgewählt, da es gegenüber in-vivo Experimenten wichtige Vorteile bietet. Aufgrund der anatomischen Verhältnisse bei in-vivo Versuchen können primäre Afferenzen der Meningen im Bereich der Dura mater encephali nur unter schwierigen Bedingungen elektrophysiologisch untersucht werden. In den eingangs beschriebenen in-vivo Experimenten (siehe Kapitel 1.2) wurden zum Beispiel aus dem Ganglion trigeminale, also direkt vom Neuron (Strassman et al., 1996), und vom Nervus nasociliaris (Bove and Moskowitz, 1997) abgeleitet. Das Versorgungsgebiet dieses Nervenastes beschränkt sich jedoch auf die frontale Orbita. In beiden Fällen wurde die Dura mater durch Trepanation des darüber liegenden Schädelknochens freigelegt, was ohne Verletzung der Dura kaum möglich ist und die genaue Eingrenzung der rezeptiven Felder erschwert.

Im Dura-Nervenpräparat wurde das Cerebellum herauspräpariert und die Dura mater mit den zugehörigen Afferenzen freigelegt. Diese Strukturen blieben im natürlichen Gewebeverband am Schädelknochen haften, so dass die Afferenzen der peripheren Nervenbündel von der arachnoidalen Seite her zugänglich waren. Durch Manipulation der Dura mater wurden somit die Bedingungen im Subduralspalt nachgestellt. Bei diesem in-vitro Modell ist daher eine genauere mechanische Stimulation des Untersuchungsgewebes gegen das Lager des Schädelknochens möglich. Die rezeptiven Felder sind direkt zugänglich, um chemische Reize zu applizieren, wie dies im pathologischen Fall z.B. bei Subarachnoidalblutungen auftreten kann. Das Gewebebad mit oxygenierter physiologischer Lösung gewährleistet außerdem eine lange Überlebensdauer des Nervengewebes.

Die Versuchsbedingungen sind zuverlässig und reproduzierbar, da variable Umweltfaktoren wie Narkoseschwankungen, Änderungen der Mikrozirkulation oder Aktivierung des vegetativen Nervensystems sie nicht

beeinflussen. Einschränkend sollte genannt werden, dass Kopfschmerzen beim Tier bislang nicht belegt sind. Bei allen Modellen, in-vitro wie in-vivo, ist somit unklar, inwieweit die experimentellen Bedingungen den pathophysiologischen Bedingungen beim Kopfschmerz entsprechen. Tierexperimentelle Untersuchungen können jedoch wichtige Hinweise für mögliche Mechanismen der Kopfschmerzentstehung geben.

### **5.2 Eigenschaften primärer Afferenzen der Dura mater der Ratte**

In der vorliegenden Arbeit waren von den 60 getesteten Fasern (sieben A<sub>δ</sub>-Fasern und 53 C-Fasern) 44 durch einen oder mehrere sensorische Reize erregbar und somit sicher Afferenzen. Sechs von zwölf Fasern waren durch thermische, chemische und mechanische Reize erregbar. Über die Hälfte (52,4%) der Fasern (n = 21) waren durch zwei der vorgenannten Reize erregbar. Es zeigte sich damit, dass die meisten untersuchten Afferenzen sicher nicht unimodal waren. Sie ähneln den polymodalen Nozizeptoren der Haut, da sie durch mehrere Stimuli aktiviert wurden.

Bei fünfzehn C-Fasern, die mit keinem sensorischen Reiz getestet wurden, wurde ein elektrophysiologisches Kriterium zur Identifizierung sympatischer Fasern verwendet (Campero et al., 2004). Der Verlauf der Slowingkurven gibt danach einen deutlichen Hinweis darauf, ob es sich um efferente Fasern handelt (de Col et al., 2008). Die fünfzehn getesteten Fasern zeigten bei 2 Hz für 180 Sekunden (bei zwei Fasern 3 Hz für 180 sec) kein deutliches Speeding nach einem initialen Slowing, wie man es bei sympatischen Fasern erwartet hätte. Mit den Untersuchungen konnten die Ergebnisse aus in-vivo Experimenten von Bove / Moskowitz bestätigt werden, dass es sich bei duralen Afferenzen um eine Fasergruppe handelt, die durch mechanische, chemische und/oder thermische Reize aktiviert werden können. Diese Eigenschaften sind denen von Nozizeptoren anderer Gewebe ähnlich (Bove and Moskowitz, 1997). Auch Strassman und Burstein arbeiteten an einem in-vivo-Modell der Dura mater und fanden

Fasern im Bereich der A<sub>δ</sub> und C-Fasern, die von unterschiedlichen sensorischen Reizen aktiviert wurden und außerdem noch eine Sensitivierung durch bestimmte chemische Reize aufwiesen (Strassman et al., 1996).

Diese beiden Arbeitsgruppen verwendeten bei der Fasersuche mechanische Reize. Im Unterschied dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die Fasern teilweise mit elektrischen Reizen gesucht, so dass auch mechanisch insensitive Fasern gefunden wurden (10% der Fasern).

Da die Marking-Methode eine saubere Ableitung der Aktionspotentiale erforderte, war im vorliegenden Modell nicht bei allen Experimenten die Durchführung aller charakterisierenden Reize möglich. Die Protokolle wurden nacheinander, oft über einen Zeitraum von Stunden durchgeführt. In der Folge waren die Fasern nach zwei bis drei Stunden zum Teil nicht mehr so zuverlässig abzuleiten, dass weitere Reizprotokolle durchgeführt werden konnten. Teilweise verschwanden die Aktionspotentiale auch nach einem Reiz, zum Beispiel nach der mechanischen Testung.

Durch die Ergebnisse der Charakterisierung der Fasern konnte gezeigt werden, dass es sich bei 73% der Fasern um Afferenzen handelt, da jede abgeleitete Faser durch mindestens einen sensorischen Reiz (thermisch, chemisch oder mechanisch) aktiviert wurde. Bei den restlichen 27% gibt das Slowing-Protokoll, zusammen mit der fehlenden Spontanaktivität, eindeutige Hinweise darauf, dass es sich auch bei diesen Fasern um afferente Neurone handelt. Bei einer Unit konnte das elektrophysiologische Kriterium nicht angewandt werden, da die Leitungsgeschwindigkeit im Bereich einer A-Faser lag. Somit ist bei dieser Faser nicht eindeutig auszuschließen, dass es sich hier um eine efferente Faser handelt. Ein Hinweis auf die Afferenz ist einzig durch die fehlende Spontanaktivität gegeben.

### **5.3 Einfluss von CGRP auf Nervenfasern der Dura mater**

#### **5.3.1 Hauptversuche CGRP-Wirkung Teil 1**

Mit den Hauptversuchen sollte die Frage geklärt werden, ob meningeale Afferenzen unter in-vitro Bedingungen durch das Neuropeptid CGRP aktiviert oder sensibilisiert werden können. Bei acht von 53 Fasern wurden eine leichte Verstärkung der Aktivität bzw. Entladungen während der Superfusion mit CGRP registriert. Bei einer Faser ging diese Verstärkung auch mit einer Änderung der Leitungslatenz einher, die über das Marking-Verfahren feststellbar war. In dem betreffenden Experiment lag die Reizfrequenz während der CGRP-Superfusion bei 0,5 Hz. Durch diesen Abstand der elektrischen Reize war die Marking-Methode ausreichend sensibel, um die zusätzliche Aktivierung in einer Änderung der Latenz wiederzuspiegeln. Bei den Fasern der sieben weiteren Experimente war die Reizfrequenz auf 0,1 Hz herabgesetzt worden, um die elektrischen Verhältnisse an der Zellmembran möglichst wenig durch künstliche elektrische Aktivität zu beeinflussen. Dies hatte zur Folge, dass die Marking-Methode nicht ausreichend sensibel für die Latenzänderungen war. Die Zeit zwischen den elektrischen Reizen reichte aus, um die Zellmembran wieder in ihren ursprünglichen Zustand zu versetzen. Die zusätzliche Aktivität der Nervenfasern führte somit nicht zu einer Änderung der Leitungsgeschwindigkeit und Leitungslatenz.

Die Änderung der Aktivität der Nervenfasern unter CGRP war in der Regel ein kurzzeitiger Effekt, der wenige Minuten dauerte. Diese Änderungen waren zu gering, um sie in ihrer Gesamtheit mit statistischen Methoden signifikant nachweisen zu können. Betrachtet man jedoch die Einzelexperimente und die Spikeaktivität, zeigte sich unter CGRP-Superfusion bei diesen acht Fasern eine höhere Gesamtzahl von Aktionspotentialen wie in Abbildung 16 dargestellt. Bei dieser zeitlich und räumlich begrenzten, leicht erhöhten Änderung der Frequenz ist nicht davon auszugehen, dass diese relevant für die Schmerzentstehung ist.



Unwahrscheinlich ist auch, dass über diesen Signalweg nachhaltige Informationen an das zentrale Nervensystem weitergeleitet werden. Insofern kann man in diesem Fall eher nicht von einer direkten Aktivierung sprechen.

Vorstellbar wäre, dass der Effekt durch eine lokale, möglicherweise indirekte Wirkung am Axon entsteht, die die Afferenzen für andere Reize sensibilisieren könnte. CGRP könnte eine niedrigere Reizschwelle für einen anderen, nicht zielgerichteten Reiz bewirken. Dies könnten z.B. andere Substanzen sein, die im Subduralspalt und im Gewebe vorkommen. Diese Reize im Hintergrund könnten aufgrund der niedrigeren Schwelle zu einer kurzen Aktivierung der Fasern führen. Als Beispiel wären neurosensibilisierende und vasoaktive Mastzellmediatoren denkbar, die aus meningealen Mastzellen freigesetzt werden (Theoharides et al., 2005). CGRP in höheren lokalen Konzentrationen führt zur Histaminfreisetzung aus Mastzellen in der Dura mater. Außerdem werden einige Afferenzen der Dura durch Histamin direkt aktiviert (Schwenger et al., 2007). Das durch CGRP aus Mastzellen freigesetzte Histamin könnte somit die Fasern aktiviert haben. Die geringe Anzahl (8/53) der mutmaßlich sensibilisierten Afferenzen ließe sich dann dadurch begründen, dass es sich bei den gewonnenen Versuchsdaten überwiegend um mechanosensitive Fasern handelt. Dagegen wurde für die meisten von Histamin aktivierten Nervenfasern kein mechanisch rezeptives Feld gefunden, diese also möglicherweise mechanoinsensitiv sind (Schwenger et al., 2007).

Auch technisch bedingte leichte Schwankungen der Badtemperatur während der Experimente könnten für eine zusätzliche Aktivierung ausreichen, da die Schwelle für eine Hitzeaktivierung in der Dura mater relativ niedrig ist. Bei sieben der hitzeaktivierten Fasern lag die Schwelle zwischen 35°C - 38,5°C (siehe 4.1).

Cumberbatch et al. (1999) zeigten, dass die systemische Bolusgabe von CGRP zu einer erhöhten Aktionspotentialfrequenz bei nicht-nozizeptiven trigeminalen Neuronen des Hirnstamms führt. Sie stellten die These auf, dass dieser Effekt auf der Vasodilatation der Gefäße beruht, die

die meningealen Afferenzen aktiviert (Cumberbatch et al., 1999). CGRP erhöht nach topischer und systemischer Gabe die Durchblutung der Meningen (Kurosawa et al., 1995). Levy et al. (2005) untersuchten die Wirkung von CGRP auf meningeale Nozizeptoren in einem in-vivo Präparat der Ratte. Sie legten mittels Craniotomie den Bereich des linken Sinus transversus frei und kombinierten diese Methode mit Laser-Doppler-Messungen der Blutflussrate der Arteria meningea media in diesem Bereich. Die mechanisch sensiblen Afferenzen mit A<sub>δ</sub> und C-Fasern, die aus dem Ganglion trigeminale abgeleitet wurden, hatten receptive Felder auf oder um (max. 1mm) den freigelegten Teil der Arteria meningea media und die parietale Dura mater. CGRP 10<sup>-4</sup> M, topisch oder intravenös appliziert, erhöhte durch seine vasodilatorische Wirkung die Blutflussrate, hatte jedoch keine aktivierenden oder sensibilisierenden Wirkungen auf die Afferenzen (Levy et al., 2005).

Die Tatsache, dass mit der in dieser Arbeit angewandten in-vitro Methode eine leichte Steigerung der Aktivierungsrate festgestellt wurde, ist kein Widerspruch zu den oben genannten Daten, sondern könnte durch Unterschiede in der Methodik erklärt werden. In den hier beschriebenen Experimenten wurden durch das Herauslösen des Gehirns die fest anliegenden inneren Schichten der Hirnhäute mit entfernt. Der experimentelle Wirkort ist somit quasi der Subarachnoidalraum. Nach außen ist die Dura mater mit dem Periosteum des Schädels verbunden.

In den Versuchen von Levy et al. (2005) wurde mittels Craniotomie die Schädelhülle entfernt. CGRP wurde intravenös verabreicht oder von der parietalen Seite der Dura mater durch dieses freigelegte Craniotomiefenster auf die Dura gegeben. Die Substanzen mussten durch die Dura mater zu ihrem Wirkungsort diffundieren. Eine Stimulation von der arachnoidalen Seite wie im verwendeten Dura-Nervenpräparat spiegelt somit eher die Bedingungen im Schädel wieder, wie sie bei einem Migräneanfall vorkommen könnten.

### 5.3.2 Hauptversuche CGRP-Wirkung Teil 2

Im zweiten Abschnitt der Versuche wurde die Wirkung von CGRP auf die aktivitätsinduzierte Änderung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing) untersucht. CGRP bewirkte eine Abflachung der Slowingkurve, so dass der Maximalwert der aktivitätsinduzierten Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit unter dem Wert der Kontrollkurve blieb (siehe Abb. 17). Dies führte zu einer statistisch signifikanten Änderung des Maximalwertes ( $n=12$ ), wie in dem Balkendiagramm (Abb. 18) deutlich wird. Dieser Effekt war reversibel, die Kontrollkurve erreichte unter SIF-Superfusion wieder einen ähnlichen Wert wie während der Referenzphase vor der CGRP-Superfusion.

Wie De Col et al. (2008) zeigten, ist die aktivitätsinduzierte Änderung der Leitungsgeschwindigkeit hauptsächlich auf die Verfügbarkeit der spannungsabhängigen Natriumkanäle zurückzuführen (siehe Kap.1.6). Sie untersuchten die Wirkung von Substanzen oder Mechanismen, wie z.B. Kälte, die zu einer Verstärkung des Slowings führen. Ouabain hemmt die Na-K-ATPase und damit die Hyperpolarisation der Membran. Da sich dadurch mehr spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle im „langsamen-inaktiven Zustand“ befinden, wird die Leitungsgeschwindigkeit langsamer (= Verstärkung des Slowings), da weniger Kanäle zur Verfügung stehen (de Col et al., 2008). Dieses „langsam-inaktive“ Stadium der Kanäle kann eine Zeitkonstante im Minutenbereich haben (Ogata and Tatebayashi, 1992).

Dieses stimmt ungefähr mit der Zeit überein, die die Nervenfasern braucht, um am Ende des Slowing-Protokolls bei 2 Hz wieder zu ihrer ursprünglichen Latenz zurückzukommen (Referenzkurve Abb. 5).

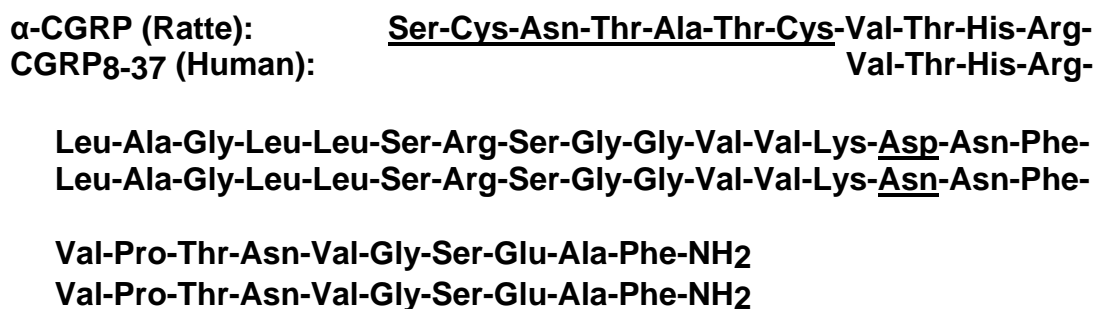
CGRP zeigte die gegenteilige Wirkung zu Ouabain: Die Substanz führt zu einer Abflachung der Kurve und zu einer Beschleunigung der Leitungsgeschwindigkeit. Die Membran hyperpolarisiert stärker und damit verkürzt sich die Dauer des „langsamen-inaktiven Zustands“. Dies bedeutet, dass unter CGRP mehr Kanäle im Zustand „geschlossen-aktivierbar“ zur Verfügung stehen müssten. Damit werden einerseits Signale schneller an

das ZNS weitergeleitet. Andererseits könnte es die Erniedrigung der Reizschwelle für andere Reize begründen, mit der die kurze Aktivierung der Fasern durch CGRP zu erklären wäre. In der Kopfschmerzsituation könnte es also zu einem verstärkten Schmerzempfinden durch CGRP kommen, da die Impulsleitung nicht durch eine langsamere Leitungsgeschwindigkeit gehemmt würde und zusätzliche Reize den Schmerz noch verstärken könnten.

### 5.3.3 Hauptversuche CGRP-Mechanismus

In den folgenden Abschnitten der Versuche sollte geklärt werden, welche Mechanismen für die höhere Verfügbarkeit der spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle unter CGRP verantwortlich sein könnten.

Es wurde zunächst der kompetitive Rezeptorantagonist  $\text{CGRP}_{8-37}$  eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Wirkung von CGRP auf die verfügbaren  $\text{Na}^+$ -Kanäle über  $\text{CGRP}_1$ -Rezeptoren vermittelt werden könnte.



**Abbildung 23:** Vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen von CGRP und  $\text{CGRP}_{8-37}$ .

Hierzu wurde das Verhalten der Leitungslatenz unter CGRP, CGRP<sub>8-37</sub> und unter beiden Substanzen zusammen getestet. CGRP<sub>8-37</sub> wurde eine Zehnerpotenz höher als CGRP angewendet, da es sich ab dieser Konzentrationsdifferenz um einen 100%igen Antagonisten handelt (Chiba et al., 1989). Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, hemmt CGRP<sub>8-37</sub> nicht die Wirkung von CGRP unter aktivitätsinduzierter Änderung der Leitungsgeschwindigkeit (Slowing). Somit bleibt der abflachende Effekt von CGRP auf die Slowingkurve erhalten und dies wird statistisch signifikant bei  $n = 11$  (Abb. 20). CGRP hat demnach nach diesem Versuchsergebnis keine direkte rezeptorvermittelte Wirkung auf Afferenzen der Dura mater über den bekannten CGRP<sub>1</sub>-Rezeptor und den G-Protein gekoppelten Signalweg.

Funktionelle CGRP Wirkungen sind teilweise nachweisbar, auch wenn eine Expression des CGRP-Rezeptorproteins RAMP1 in manchen Geweben (z.B. dem Cerebellum) fehlt (Brain et al., 2002). Dies deutet auf eine Heterogenität der Rezeptoren hin (Poyner et al., 2002). Durch Zellkultur-Experimente hat sich gezeigt, dass auch die anderen Rezeptoren der Calcitonin-Familie eine Kreuzreaktivität für CGRP besitzen (Christopoulos et al., 1999; Muff et al., 1999). Der Antagonist CGRP<sub>8-37</sub> hat eine geringere Wirksamkeit für diese Rezeptoren. Von diesen weiteren Rezeptoren der Calcitonin Familie könnten nach ihrer vorhandenen Affinität für CGRP und ihrer geringeren Wirksamkeit für CGRP<sub>8-37</sub> die AM<sub>2</sub> Rezeptoren oder die AMY<sub>1(a)</sub> Rezeptoren der Gruppe der CGRP<sub>2</sub> Rezeptoren entsprechen. Dies bedarf jedoch noch einiger Aufklärung, da diese Hinweise noch nicht validiert wurden anhand von Untersuchungen über die RAMP-Protein Expression und die dazugehörige pharmakologische Wirkungsweise von CGRP (Hay, 2007).

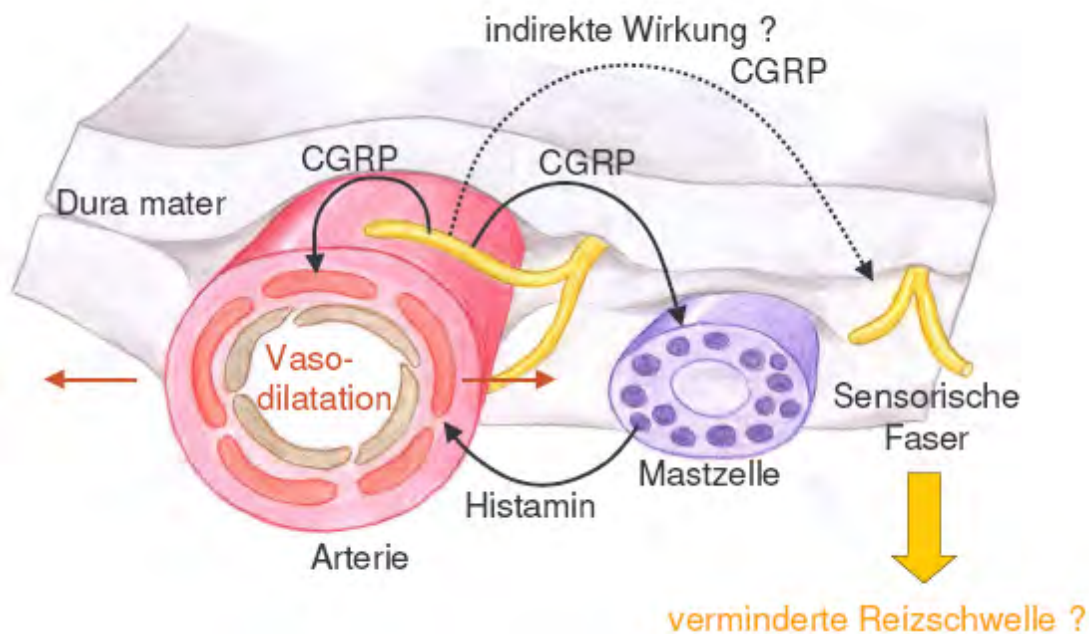
Im nachfolgenden Versuchsabschnitt wurde das Sulfonylharnstoffderivat Glibenclamid eingesetzt. Nach Daten von Dunn et al. (2003) verursacht CGRP in einer Konzentration von  $10^{-9}$  M oder  $10^{-8}$  M bei primären Afferenzen mesenterialer Arterien der Ratte eine Hyperpolarisation der Zellmembran. Dieser hyperpolarisierende Effekt konnte durch Glibenclamid blockiert werden. CGRP<sub>8-37</sub> führte jedoch zu keiner Hemmung des hyperpolarisierenden Effekts. Diese Daten weisen darauf hin, dass an der glatten Gefäßmuskulatur freigesetztes CGRP über Glibenclamid-sensitive Kaliumkanäle wirkt (Dunn et al., 2003). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass Glibenclamid die CGRP vermittelte Vasodilatation an pialen Arteriolen der Ratte hemmt (Hong et al., 1996). Die Substanz wurde einzeln ( $10^{-5}$  M) oder in Kombination mit CGRP ( $10^{-7}$  M) eingesetzt.

Glibenclamid hatte in den vorliegenden Experimenten einen starken Eigeneffekt (Abb. 21) und verstärkte die aktivitätsinduzierte Änderung der Leitungsgeschwindigkeit, d.h. die Leitungsgeschwindigkeit wurde noch stärker verlangsamt. Bei der Kombination beider Substanzen, CGRP und Glibenclamid, ist die Leitungsgeschwindigkeit ebenfalls stärker verlangsamt. Die CGRP-Wirkung wird entweder nicht blockiert oder der Glibenclamid-Effekt maskiert die CGRP-Wirkung, so dass nicht festzustellen ist, ob die CGRP Wirkung blockiert oder noch vorhanden ist. Auch CGRP als Einzelsubstanz führt in diesen Experimenten zu einer verstärkten Latenzänderung. Da Glibenclamid lipophil ist, ist es möglich, dass die Dauer der Spülphase nach der Superfusion mit CGRP und Glibenclamid zu kurz war, um die Substanz vollständig auszuwaschen. Dies erklärt möglicherweise die Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit durch CGRP als Einzelsubstanz.

#### 5.3.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Aus den ermittelten Daten kann geschlossen werden, dass CGRP bei manchen Afferenzen zu einer kurzen zusätzlichen Aktivierung führt. Es lässt sich nicht eindeutig festlegen, ob diese direkt oder indirekt vermittelt ist. Die Wirkung scheint nicht direkt mit dem bekannten CGRP<sub>1</sub>-Rezeptor gekoppelt zu sein und über die mögliche Wirkung über AM<sub>2</sub> Rezeptoren oder AMY<sub>1(a)</sub>-Rezeptoren kann bis jetzt nur spekuliert werden. Für einen indirekten Effekt und gegen die Wirkung über einen Rezeptor aus der Calcitonin-Familie spräche auch die scheinbar agonistische Tendenz von CGRP<sub>8-37</sub> auf die Slowingkurve, die durch die bisher bekannten Rezeptoreigenschaften nicht erklärt werden kann.

Immunhistologische Daten von Lennerz et al. (2008) geben Hinweise darauf, dass die Wirkung des CGRP indirekt über die bekannten CGRP-Rezeptoren vermittelt sein könnte. Mittels Immunhistochemie wurde die Lokalisation der CGRP-Rezeptoren untersucht. Der CGRP-Rezeptor befindet sich nicht auf den Nervenendigungen der Dura mater encephali, sondern er ist in diesem Bereich vor allem auf den Schwann-Zellen der Nervenfasern zu finden (Lennerz et al., 2008). Damit besteht die Möglichkeit eines indirekten Wirkungsmechanismus. CGRP könnte an den CGRP-Rezeptor auf den Schwann-Zellen binden und mit der G-Protein gekoppelten Kaskade über eine Verschiebung des Membranpotentials zu einer Änderung der Ionenverhältnisse im Interzellulärspalt und damit zu erhöhter Erregbarkeit der Axonmembran führen. Dies könnte auch entsprechende Änderungen in der Umgebung der Endigung und eine Art Sensibilisierung der nozizeptiven Faser bewirken. Hier stellt sich jedoch die Frage, weshalb der Rezeptorantagonist CGRP<sub>8-37</sub> in den Experimenten die Wirkung von CGRP nicht gehemmt hat.



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung der Dura mater encephali mit Arterie, Mastzelle und sensorischen Nervenfasern. CGRP führt über die Gefäßmuskulatur zu einer Vasodilatation der Arterie. Des Weiteren kann CGRP Mastzellen degranulieren und Histamin freisetzen. Die in den Versuchen aufgezeigte Änderung der Leitungsgeschwindigkeit und die eventuell daraus resultierende verminderte Reizschwelle ist möglicherweise eine indirekte Wirkung von CGRP auf die sensible Faser.

CGRP führt nach den Schlussfolgerungen über die Ursache des aktivitätsabhängigen Slowings offensichtlich zu mehr verfügbaren  $\text{Na}^+$ -Kanälen unter aktivitätsinduzierter Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit: Die Leitungsgeschwindigkeit nimmt wieder etwas zu bzw. weniger stark ab. CGRP verringert während repetitiver Aktivität vermutlich die Zahl der inaktivierten Kanäle, möglicherweise durch eine stärkere Hyperpolarisation der Membran. Jedenfalls werden dadurch nozizeptive Signale schneller weitergeleitet. Die Konsequenz daraus, dass sich dadurch auch die Reizschwelle für noxische Reize vermindert, ist noch nicht gesichert. Wenn die aktivitätsinduzierte Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit Teil einer verminderten Erregbarkeit von Nozizeptoren ist, dann hieße das, dass CGRP gegen diesen Vorgang wirkt und nozizeptive Signale effektiver macht.



### **6      Zusammenfassung**

Meningeale Afferenzen innervieren die großen intracerebralen Gefäße und die Dura mater encephali, eine schützende Hülle für das Gehirn, welches selbst keine sensible Innervation besitzt. Die funktionelle Einheit aus intracraniellen sensorischen Nervenfasern und den innervierten Blutgefäßen wird als trigemino-vaskuläres System bezeichnet. Es spielt vermutlich die entscheidende Rolle bei der Kopfschmerzentsstehung. Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) ist eine Schlüsselsubstanz bei der Entstehung der Migräne und anderer primärer Kopfschmerzen. Das Neuropeptid wird von einem großen Teil der trigeminalen afferenten Neurone exprimiert, wirkt vasodilatatorisch auf arterielle Gefäße und hat im trigeminalen Hirnstamm die Funktion eines Neurotransmitters.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Eigenschaften der primären Afferenzen der Dura mater und die Wirkung von CGRP auf diese Nervenfasern zu erforschen. Des Weiteren wurde der Effekt von CGRP auf die Leitungseigenschaften der Fasern anhand der Wirkung auf das sogenannte Slowing überprüft. Hierbei handelt es sich um eine aktivitätsinduzierte Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit, die sich hauptsächlich auf die abnehmende Verfügbarkeit spannungsabhängiger Natriumkanäle zurückführen lässt.

Für die elektrophysiologische Ableitung meningealer Afferenzen in vitro wurde ein neu entwickeltes Dura-Nervenpräparat des halbierten superfundierten Rattenschädels benutzt. Die Signale wurden von einem Nervenast des Ramus meningeus des Nervus mandibularis, vergleichbar dem humanen Nervus spinosus, abgeleitet. Aus der Mehrfaserableitung konnte durch die Darstellung der Aktionspotentiale bei repetitiver elektrischer Reizung das Latenzverhalten einzelner Fasern isoliert beobachtet werden.

Insgesamt wurden 60 langsam leitende Einzelfasern (Leitungsgeschwindigkeit 0,22 - 6,67 m/s) untersucht. Es wurde bestätigt, dass es sich bei den meningealen Afferenzen um polymodale sensorische Fasern handelt, da der Großteil durch mehr als einen Reiz - mechanisch, thermisch (Hitze) und/oder chemisch (Capsaicin) - stimuliert werden konnte.

Die Superfusion mit CGRP führte bei acht von 53 Fasern zu einer zeitlich verzögerten leichten Zunahme der neuronalen Aktivität. Des Weiteren bewirkte CGRP bei allen Afferenzen eine statistisch signifikante Abflachung der Slowingkurven, d.h. eine Abschwächung der aktivitätsinduzierten Verminderung der Leitungsgeschwindigkeit. Mit dem selektiven Rezeptorantagonisten CGRP<sub>8-37</sub> konnte dieser Effekt allerdings nicht aufgehoben werden. Die Vermutung, dass CGRP über Glibenclamid-sensitive Kaliumkanäle wirkt, konnte nicht bestätigt werden, da Glibenclamid einen starken Eigeneffekt auf das Slowing hatte.

Die beobachteten CGRP-Effekte werden entweder indirekt oder überhaupt nicht über G-Protein-gekoppelte CGRP-Rezeptoren vermittelt, da bisher CGRP-Rezeptoren nur auf den Schwannzellen der Nervenfasern in der Dura mater nachgewiesen wurden. Aus der Abflachung der Slowingkurven lässt sich jedenfalls schließen, dass unter dem Einfluss von CGRP mehr verfügbare spannungsabhängige Natriumkanäle auf den Axonen zur Verfügung stehen. Somit werden nozizeptive Reize schneller an das Zentralnervensystem weitergeleitet und die Nervenfasern werden bei Aktivität nicht so schnell blockiert, was wahrscheinlich auch mit einer erniedrigten Reizschwelle für noxische Reize einhergeht. Dies wäre möglicherweise auch eine Erklärung für die Zunahme der Aktivität einiger Afferenzen unter CGRP-Superfusion.

## 7 **Summary**

Meningeal afferents innervate main intracerebral blood vessels and the dura mater encephali, a protecting sheath for the central nervous system. The latter has no sensitive innervation on its own. The trigeminovascular system, which consists of intracranial vessels and their sensory innervation, is presumably involved in the development of headaches. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is supposed to play a key role in the generation of migraine and other primary headaches. This neuropeptide is contained in and released from a major part of trigeminal afferent neurons. It acts as a vasodilator at arteries and as a neurotransmitter in the trigeminal brainstem.

The aim of this study was to analyse the characteristics of dural primary afferents and the action of CGRP on these nerve fibres. Furthermore, the effect of CGRP on the conduction properties of these fibres was studied using the slowing phenomenon as parameter. Slowing is an activity-induced decrease in conduction velocity, which is linked to the decreasing availability of voltage-dependent sodium channels.

A newly developed dura-nerve preparation of the superfused rat skull half was used for electrophysiological recordings of meningeal afferents from the meningeal branch of the mandibular nerve, which is comparable to the human spinosus nerve. On the basis of multi-unit recordings latency changes of single units could be observed through action potentials elicited by repetitive electrical stimulation.

A total of 60 slowly conducting units (conduction velocity 0.22 - 6.67 m/s) were analysed. The meningeal afferents responded usually to more than one stimulus (mechanical, thermal and/or chemical stimulation by capsaicin) and can therefore be classified as polymodal afferents.

CGRP superfusion caused a delayed and short-lasting increase in neuronal activity in eight of 53 fibres. In addition, CGRP affected all afferents causing a significant flattening of the slowing profile, i.e. the activity-induced slowing of the conduction velocity was reduced. This effect

was not inhibited by the selective CGRP receptor antagonist CGRP<sub>8-37</sub>. The presumption that CGRP acts through glibenclamide-sensitive potassium channels could not be confirmed, because glibenclamide itself had a strong effect on the slowing.

It is concluded that the effects of CGRP are either indirect or they are not mediated through G-protein-coupled CGRP receptors, since CGRP receptors have only been found on the Schwann cells of dural nerve fibres so far. However, the flattening of the slowing profile suggests that CGRP increases the availability of voltage-dependant sodium channels of the axons. Consequently, nociceptive signals are transmitted to the central nervous system at a higher rate and the activity of the nerve fibres is blocked later on, which probably comes along with a reduced threshold for noxious stimuli. This could be an explanation for the increased activity of some afferents under CGRP superfusion.

## **8      Literaturverzeichnis**

Amara SG, Jonas V, Rosenfeld MG, Ong ES, Evans RM (1982) Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* 298: 240-244.

Arulmani U, Maassenvandenbrink A, Villalon CM, Saxena PR (2004) Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *Eur J Pharmacol* 500: 315-330.

Bove GM, Moskowitz MA (1997) Primary afferent neurons innervating guinea pig dura. *J Neurophysiol* 77: 299-308.

Brain SD, Poyner DR, Hill RG (2002) CGRP receptors: a headache to study, but will antagonists prove therapeutic in migraine? *Trends Pharmacol Sci* 23: 51-53.

Bretag AH (1969) Synthetic interstitial fluid for isolated mammalian tissue. *Life Sci* 8: 319-329.

Campero M, Serra J, Bostock H, Ochoa JL (2004) Partial reversal of conduction slowing during repetitive stimulation of single sympathetic efferents in human skin. *Acta Physiol Scand* 182: 305-311.

Chiba T, Yamaguchi A, Yamatani T, Nakamura A, Morishita T, Inui T, Fukase M, Noda T, Fujita T (1989) Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist human CGRP-(8-37). *Am J Physiol* 256: E331-E335.

Christopoulos G, Perry KJ, Morfis M, Tilakaratne N, Gao Y, Fraser NJ, Main MJ, Foord SM, Sexton PM (1999) Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol* 56: 235-242.

Cumberbatch MJ, Williamson DJ, Mason GS, Hill RG, Hargreaves RJ (1999) Dural vasodilation causes a sensitization of rat caudal trigeminal neurones in vivo that is blocked by a 5-HT<sub>1B/1D</sub> agonist. *Br J Pharmacol* 126: 1478-1486.

de Col R, Messlinger K, Carr RW (2008) Conduction velocity is regulated by sodium channel inactivation in unmyelinated axons innervating the rat cranial meninges. *J Physiol* 586: 1089-1103.

Dennis T, Fournier A, St Pierre S, Quirion R (1989) Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J Pharmacol Exp Ther* 251: 718-725.

Dunn WR, Hardy TA, Brock JA (2003) Electrophysiological effects of activating the peptidergic primary afferent innervation of rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 140: 231-238.

Edvinsson L (2004) Blockade of CGRP receptors in the intracranial vasculature: a new target in the treatment of headache. *Cephalalgia* 24: 611-622.

Edvinsson L, Uddman R (2005) Neurobiology in primary headaches. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 438-456.

Goadsby PJ (2005) Migraine pathophysiology. *Headache* 45 Suppl 1: S14-S24.

Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R (1990) Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol* 28: 183-187.

Hay DL (2007) What makes a CGRP<sub>2</sub> receptor? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34: 963-971.

Hong KW, Yoo SE, Yu SS, Lee JY, Rhim BY (1996) Pharmacological coupling and functional role for CGRP receptors in the vasodilation of rat pial arterioles. *Am J Physiol* 270: H317-H323.

Kress M, Koltzenburg M, Reeh PW, Handwerker HO (1992) Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro. *J Neurophysiol* 68: 581-595.

Kurosawa M, Messlinger K, Pawlak M, Schmidt RF (1995) Increase of meningeal blood flow after electrical stimulation of rat dura mater encephali: mediation by calcitonin gene-related peptide. *Br J Pharmacol* 114: 1397-1402.

Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B, Olesen J (2002) CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia* 22: 54-61.

Lennerz JK, Ruhle V, Ceppa EP, Neuhuber WL, Bunnett NW, Grady EF, Messlinger K (2008) Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *J Comp Neurol* 507: 1277-1299.

Levy D, Burstein R, Strassman AM (2005) Calcitonin gene-related peptide does not excite or sensitize meningeal nociceptors: implications for the pathophysiology of migraine. *Ann Neurol* 58: 698-705.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-339.

Messlinger K, Hanesch U, Baumgartel M, Trost B, Schmidt RF (1993) Innervation of the dura mater encephali of cat and rat: ultrastructure and calcitonin gene-related peptide-like and substance P-like immunoreactivity. *Anat Embryol (Berl)* 188: 219-237.

Messlinger K, Hanesch U, Kurosawa M, Pawlak M, Schmidt RF (1995) Calcitonin gene related peptide released from dural nerve fibers mediates increase of meningeal blood flow in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 1020-1024.

Muff R, Buhlmann N, Fischer JA, Born W (1999) An amylin receptor is revealed following co-transfection of a calcitonin receptor with receptor activity modifying proteins-1 or -3. *Endocrinology* 140: 2924-2927.

Ogata N, Tatebayashi H (1992) Slow inactivation of tetrodotoxin-insensitive Na<sup>+</sup> channels in neurons of rat dorsal root ganglia. *J Membr Biol* 129: 71-80.

Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM (2004) Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med* 350: 1104-1110.

Olesen J, Steiner TJ (2004) The International classification of headache disorders, 2nd edn (ICDH-II). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75: 808-811.

Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V (2003) ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4: 529-539.

Poyner DR, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM (2002) International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev* 54: 233-246.



Ray, B. S. and Wolff, H. G. Experimental studies on headache: pain-sensitive structures of the head and their significance in headache. Arch.Surg. 41, 813-856. 1940.

Ref Type: Generic

Reeh PW (1986) Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. Neurosci Lett 66: 141-146.

Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW, Evans RM (1983) Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. Nature 304: 129-135.

Ruiz dV, I, Gonzalez N, Etxeberria Y, Garcia-Monco JC (2003) Quality of life in migraine patients: a qualitative study. Cephalalgia 23: 892-900.

Schmelz M, Forster C, Schmidt R, Ringkamp M, Handwerker HO, Torebjork HE (1995) Delayed responses to electrical stimuli reflect C-fiber responsiveness in human microneurography. Exp Brain Res 104: 331-336.

Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjork HE, Handwerker HO (2003) Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. J Neurophysiol 89: 2441-2448.

Schmidt R, Schmelz M, Weidner C, Handwerker HO, Torebjork HE (2002) Innervation territories of mechano-insensitive C nociceptors in human skin. J Neurophysiol 88: 1859-1866.

Schwenger N, Dux M, de Col R, Carr R, Messlinger K (2007) Interaction of calcitonin gene-related peptide, nitric oxide and histamine release in neurogenic blood flow and afferent activation in the rat cranial dura mater. Cephalalgia 27: 481-491.

Segond vB, Pastor A, Biskup C, Schlegel C, Benndorf K, Schaible HG (2002) Localization of functional calcitonin gene-related peptide binding sites in a subpopulation of cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 110: 131-145.

Strassman AM, Levy D (2006) Response properties of dural nociceptors in relation to headache. *J Neurophysiol* 95: 1298-1306.

Strassman AM, Raymond SA, Burstein R (1996) Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* 384: 560-564.

Thalhammer JG, Raymond SA, Popitz-Bergez FA, Strichartz GR (1994) Modality-dependent modulation of conduction by impulse activity in functionally characterized single cutaneous afferents in the rat. *Somatosens Mot Res* 11: 243-257.

Theoharides TC, Donelan J, Kandere-Grzybowska K, Konstantinidou A (2005) The role of mast cells in migraine pathophysiology. *Brain Res Brain Res Rev* 49: 65-76.

Tvedskov JF, Lipka K, Ashina M, Iversen HK, Schifter S, Olesen J (2005) No increase of calcitonin gene-related peptide in jugular blood during migraine. *Ann Neurol* 58: 561-568.

Vater A, 2004, Entwicklung eines Verfahrens zur Identifizierung kurzer hochaffiner RNA-Oligonukleotide am Beispiel von CGRP-antagonisierenden Spiegelmeren. Dissertation, Technische Universität Berlin.

Wedekind C (1997) Receptive properties of primary afferent fibres from rabbit pleura, in vitro. *Somatosens Mot Res* 14: 229-236.

Weidner C, Schmidt R, Schmelz M, Hilliges M, Handwerker HO, Torebjork HE (2000) Time course of post-excitatory effects separates afferent human C fibre classes. *J Physiol* 527 Pt 1: 185-191.

Wimalawansa SJ (1996) Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr Rev* 17: 533-585.

### **9      Danksagung**

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben:

An erster Stelle gilt mein allerherzlichster Dank Herrn Prof. Dr. Karl Meßlinger für die Überlassung des elektrophysiologischen Themas und für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Meinen Dank für sein immer offenes Ohr, seine unermüdliche wissenschaftliche Unterstützung, seine konstruktive Kritik und seine gute Betreuung. Danke auch für das gesellige jährliche Sommerfest.

Herrn Dr. Roberto de Col und Herrn Dr. Richard Carr danke ich für die Einarbeitung in die Methodik und für die Einblicke in die Elektronik. Auch ihnen ein herzliches Danke für motivierende Worte und das Aufzeigen von Auswegen aus experimentellen Sackgassen. Die Kaffeepausen mit ihnen waren Gold wert.

Herrn Prof. Dr. Martin Diener danke ich für die spontane Zusage und die gute Betreuung dieser externen Doktorarbeit, für seine Hilfsbereitschaft und die fachlichen Anregungen bei der Erstellung des Manuskriptes.

Herrn PD Dr. Michael Jochen Marco Fischer danke ich für die Unterstützung bei der Statistik und die Einführung in die Programme zur Erstellung von Abbildungen und Postern.

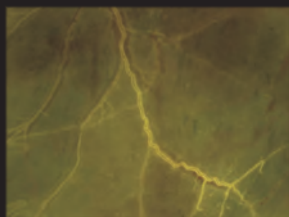
Frau Birgit Vogler, Frau Jana Schramm und Frau Maria Schulte danke ich für die Präparationen und die Einarbeitung in die wissenschaftliche Laborarbeit.

Rebecca Winkelmann, Dr. Tali Hoffmann, Katrin Kistner und Verena Krauss danke ich für die Unterstützung und die fruchtbaren - teils wissenschaftlichen und teils privaten - Diskussionen während zahlreicher Mittagspausen und Telefonate.

Einen großen Dank an meine Eltern Marlis und Horst Söhngen und an meinen Bruder Martin Söhngen. Sie stehen stets hinter mir, unterstützen meine Entscheidungen und fördern meine Träume.

Einen ganz besonderen Dank an meinen Mann Leonard Bär für seine Liebe und sein tiefes Vertrauen in meine Fähigkeiten. Er war während der Zeit des Studiums, der Promotion und ist heute noch mein Fels in der Brandung.

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis niedergelegt sind, eingehalten.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5440-7



9 1783835195440 3